

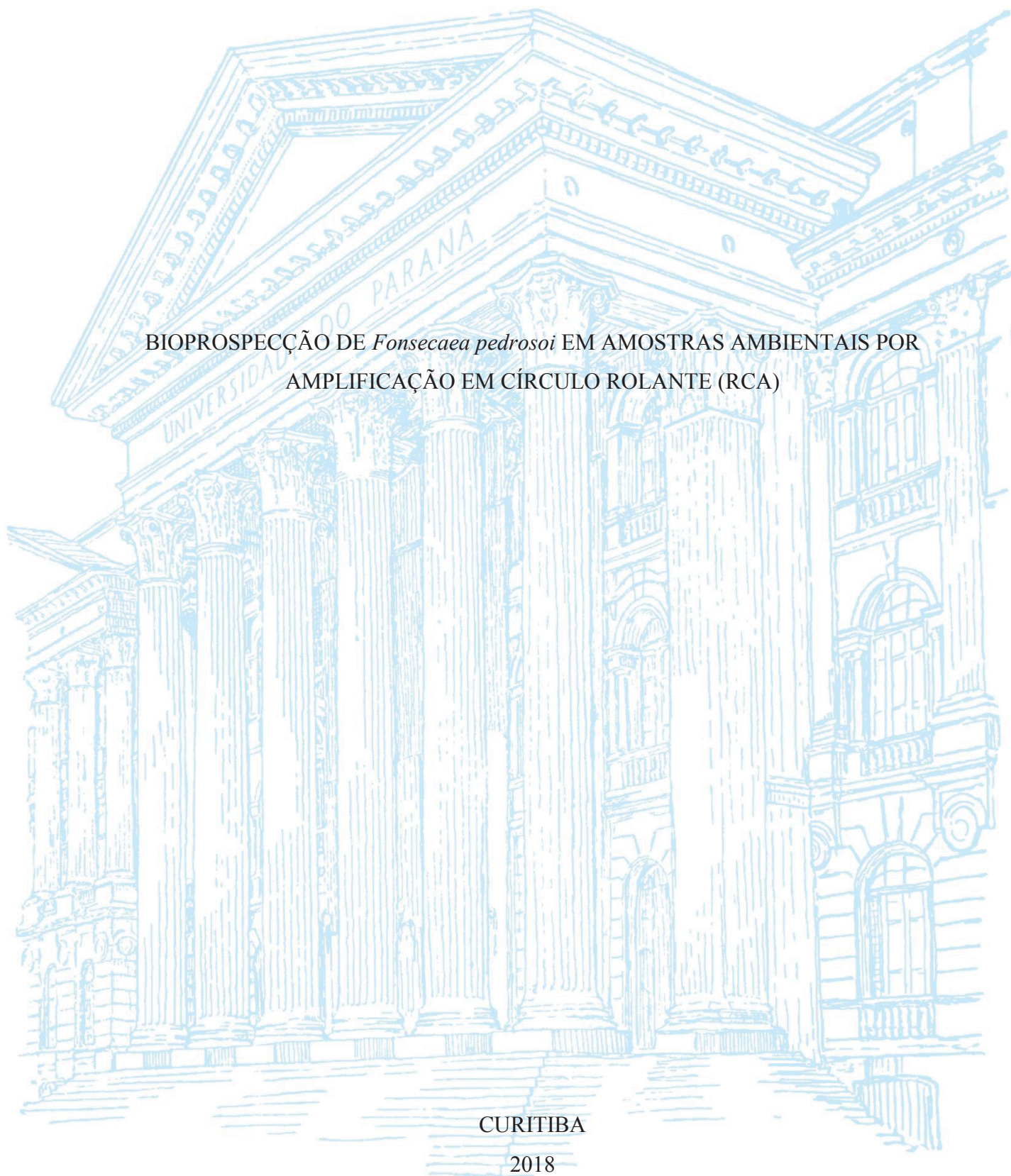
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MORGANA FERREIRA VOIDALESKI

BIOPROSPECÇÃO DE *Fonsecaea pedrosoi* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS POR
AMPLIFICAÇÃO EM CÍRCULO ROLANTE (RCA)

CURITIBA

2018



MORGANA FERREIRA VOIDALESKI

BIOPROSPECÇÃO DE *Fonsecaea pedrosoi* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS POR
AMPLIFICAÇÃO EM CÍRCULO ROLANTE (RCA)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Vania Aparecida Vicente
Coorientadora: Profa. Dra. Renata Rodrigues Gomes

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Voidaleski, Morgana Ferreira

Bioprospecção de *Fonsecaea pedrosoi* em amostras ambientais por amplificação em círculo rolante (RCA). / Morgana Ferreira Voidaleski. – Curitiba, 2018.

73 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Vania Aparecida Vicente

Coorientadora: Renata Rodrigues Gomes

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Cromoblastomicose. 2. Fungos. 3. Bioprospecção. I. Título II. Vicente, Vania Aparecida. III. Gomes, Renata Rodrigues. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 589.2



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

“Bioprospecção de *Fonsecaea pedrosoi* em amostras ambientais por amplificação em círculo rolante (RCA)”

por

Morgana Ferreira Voidaleski

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:

Profa. Dra. Vânia Aparecida Vicente – Presidente

Profa. Dra. Ida Chapaval Pimentel

Profa. Dra. Lygia Vitória Galli Terasawa

Curitiba, 23 de março de 2018.

Aos pacientes portadores da doença Cromoblastomicose

Aos meus pais Alexandrina e Fernando;

Aos meus irmãos Amanda e João.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela vida, por me guiar sempre a trilhar o caminho certo, permitir usar os dons que me deu em uma razão maior, e por amar especialmente a mim;

Aos meus pais, Fernando Voidaleski e Alexandrina Voidaleski, por serem dois anjos que me regem e que me guardam, por me amarem incondicionalmente, pelo apoio e por entenderem que meu propósito sempre foi maior do que as expectativas deles;

Aos meus irmãos João Voidaleski e Amanda Voidaleski, pelo amor, companheirismo, incentivo e orgulho;

A toda minha família pelo orgulho e amor confiados a mim;

A Profa. Dra. Vania Aparecida Vicente, pela orientação, oportunidade, incentivo e por toda confiança e atenção nesse período;

A Profa. Dra. Renata Rodrigues Gomes pela orientação, colaboração e apoio científico dedicado ao trabalho;

A Dra. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo e sua equipe da Universidade Federal do Maranhão pela realização das coletas, exercendo intensa contribuição com os resultados desse trabalho;

A Michely Laís de Oliveira, Suelem Kluconski de Campos e Sandriele Noriler, amigas e irmãs que estiveram presentes nesse período. Compartilhamos muitos momentos especiais, vocês sempre são parte da minha vida e moram no meu coração com muito amor e carinho;

Aos amigos do LabMicro, pela amizade, carinho, companheirismo, momentos de descontração e auxílio nos experimentos. Vocês foram muito importantes nesse período.

Aos professores Roberto Degenhardt e Fernanda Maurer D'Agostini, pois foi o carinho e incentivo de vocês, responsável por instigar-me a iniciar minha trajetória acadêmica. Que meus passos sejam reflexos dos seus.

Aos meus amigos biólogos Bruna Petry, Gisele Daros, Tailine Mota, Aline Pelizzer, Andressa Dias, Juliana Matté, Franciele Mattos e Jean Carlos May. A amizade de vocês é muito importante e eu lhes agradeço por tudo sempre.

Aos amigos maravilhosos que a vida sempre me presenteia, são vocês quem me apoiam, incentivam e mesmo longe estão comigo.

Aos professores, a Universidade Federal do Paraná e ao programa de Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela formação e conhecimento.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Como todo amor e carinho, Muito Obrigada

“Ama-se mais o que se conquista com esforço. ”

Benjamin Disraeli

RESUMO

As Leveduras negras são fungos ascomicetos pigmentados de desenvolvimento lento predominantemente leveduriforme que ocupam diversos nichos ecológicos nos ecossistemas. As espécies associadas a infecções em hospedeiros humanos e animais estão taxonomicamente acomodadas na ordem Chaetothyriales dentro da família Herpotrichiellaceae, reunindo entre outros os agentes causais da doença cromoblastomicose, uma micose subcutânea crônica, caracterizada pela presença de corpos muriformes no tecido hospedeiro. Dados epidemiológicos demonstram que a infecção ocorre por implantação frequentemente associada a um trauma por fragmentos vegetais. A região norte do Brasil é considerada área endêmica da doença, principalmente devido às características ocupacionais predominantemente rurais e extrativistas da população. O maior agente etiológico da cromoblastomicose é a espécie *Fonsecaea pedrosoi*, porém sua recuperação de substratos ambientais é restrita. Neste contexto, o objetivo principal deste estudo foi a investigação ambiental de *F. pedrosoi* em diversos nichos e substratos, através de amostras procedentes de áreas endêmicas da doença, por meio de ferramentas moleculares e métodos específicos de isolamento. Um total de 87 amostras foi analisado por ambos os métodos. Para o *screening* molecular foi aplicado o método de sonda cadeado baseado na técnica de Amplificação em Círculo Rolante (RCA) no DNA total das amostras estudadas. O agente de cromoblastomicose *F. pedrosoi* foi detectado pela sonda e amplificado por RCA em amostras de solo, material em decomposição e folha da planta *Solanum paniculatum* (jurubeba). O limite de detecção do método foi de 2.88×10^7 cópias do DNA de interesse. Para o isolamento foi utilizado o método seletivo de flotação em óleo mineral e a identificação dos isolados foi realizada por marcadores morfológicos e moleculares. Através do isolamento foram recuperadas 175 colônias negras, sendo 08 isolados morfológicamente semelhantes aos agentes de cromoblastomicose, identificados molecularmente como *F. multimorphosa* (n=01), *F. brasiliensis* (n=04), *C. ambigua* (n=02) e *C. guayanensis* (n=01). Das amostras selecionadas pelo método molecular não foi possível recuperar nenhuma linhagem de espécies relacionadas à doença cromoblastomicose. Este foi o primeiro estudo a utilizar o método de sonda cadeado baseado em RCA como ferramenta de seleção ambiental o qual demonstrou a presença do DNA de *F. pedrosoi* em plantas. Entretanto, a baixa taxa de desenvolvimento e a natureza oligotrófica das espécies patogênicas, pode limitar a recuperação por métodos de isolamento, justificando a limitação do método e não recuperação das espécies patógenas das amostras positivas. Em conclusão, a sonda cadeado baseada em RCA é uma ferramenta adicional nos estudos destes agentes, a qual pode contribuir para inferência de dados sobre rotas de infecção da cromoblastomicose e da ocorrência ambiental destes patógenos.

Palavras-chave: Leveduras negras. Sonda cadeado. Detecção ambiental. Chaetothyriales. Cromoblastomicose.

ABSTRACT

Black yeasts are melanized ascomycetous fungi, predominantly yeast-like, present in many ecological niches and ecosystems. The species associated with human and animal infections belong to the Chaetothyriales order, Herpotrichiellaceae family. Chromoblastomycosis is a chronic subcutaneous mycosis characterized by the presence of muriform cells in the host tissue. Epidemiological data demonstrate that the infection occurs by the implantation of the black yeast by trauma with plant fragments. The northern region of Brazil is an endemic area of the disease, due to the predominantly rural and extractive occupational characteristics of the population. The major etiological agent of chromoblastomycosis is *Fonsecaea pedrosoi*, but its recovery from environmental substrates is restricted. In this context, this study aim to investigate the presence of *F. pedrosoi* in several ecological niches and substrates from endemic areas of chromoblastomycosis by molecular tools and isolation by flotation in mineral oil. A total of 87 samples were analyzed for both methods. For the molecular screening, we applied the padlock probe based on the Rolling Circle Amplification (RCA) in the total DNA of the samples studied. *Fonsecaea pedrosoi* was detected by the padlock probe and RCA in soil, decomposing plant material and leaf of the plant *Solanum paniculatum* (jurubeba). The limit of detection of this method was 2.88×10^7 copies of the DNA. The selective method of flotation in mineral oil was performed and the isolates were identified by morphological and molecular markers. A total of 175 black colonies were recovered, 8 were macro and micromorphology similar to chromoblastomycosis agents and were identified by molecular methods as *F. multimorphosa* (n = 1), *F. brasiliensis* (n = 4), *C. ambigua* (n = 2) and *C. guayanensis* (n = 1). From the samples positive by the molecular method, no chromoblastomycosis agents were isolated. This was the first study to use padlock probe based on RCA for environmental detection of *F. pedrosoi* DNA in plants. In addition, the low development and the oligotrophic nature of the pathogenic species may limit the isolation by conventional techniques. In conclusion, the padlock probe based on RCA is an additional tool for these agents studies and contributes to elucidate the infection routes of chromoblastomycosis and environmental occurrence of these pathogens.

Key-words: Black yeasts. Padlock Probe. Environmental detection. Chaetothyriales, Chromoblastomycosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

FIGURA 1- MORFOLOGIA DAS LEVEDURAS NEGRAS DA FAMÍLIA HERPOTRICHIELLACEAE.	20
FIGURA 2- ASPECTOS CLÍNICOS DA CROMOBLASTOMICOSE.	21
FIGURA 3- DESENHO DE SONDA CADEADO, LIGAÇÃO E RCA.	29

CAPÍTULO II

FIGURA 1- REGIÕES ENDÊMICAS PARA CROMOBLASTOMICOSE (CBM) NO BRASIL E CIDADES DE COLETA NO ESTADO MARANHÃO.	44
FIGURA 2- ESQUEMA DE ANÁLISE POR RCA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS.	50
FIGURA 3- ÁRVORE FILOGENÉTICA CYPHELLOPHORACEAE E HERPOTRICHIELLACEAE	52
FIGURA 4- AMOSTRAS AMBIENTAIS POSITIVAS PARA RCA.	53
FIGURA 5-TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE RCA.	54

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1- LINHAGENS DE REFERENCIA DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA HERPOTRICHIELLACEAE E CYPHELLOPHORACEAE.....	47
TABELA 2- IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS LINHAGENS SELECIONADAS.....	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DNA	-	Deoxyribonucleic acid
RCA	-	Rolling Circle Amplification
FOP	-	Sonda Cadeado para <i>Fonsecaea pedrosoi</i>
UV	-	Ultravioleta
<i>in vitro</i>	-	Fora do organismo vivo, em tubo de ensaio.
<i>in vivo</i>	-	Em organismos vivos
SNP	-	Single Nucleotide Polymorphism
PCR	-	Polymerase Chain Reaction
et al.	-	Colaboradores
min	-	Minuto
ITS	-	Internal Transcribed Spacer
NCBI	-	National Center for Biotechnology Information
CTAB	-	Brometo de cetil-trimetilamônio
CIA	-	Clorofórmio álcool isoamílico
h	-	Hora
CMRP	-	Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense
DTT	-	Ditiotreitol
RCA1	-	Iniciador para Rolling Circle Amplification
RCA2	-	Iniciador para Rolling Circle Amplification
Like	-	Tal como a espécie já identificada

LISTA DE SÍMBOLOS

spp	-	mais de uma espécie de um gênero
IgM	-	imunoglobulina M
mm	-	Milímetro
%	-	Porcentagem
g	-	Grama
mL	-	Microlitro
U	-	Unidades
µg	-	Micrograma
L	-	Litro
°C	-	graus celsius
mg	-	Miligrama
G	-	força gravitacional
µmol	-	micro mol
mmoL	-	mili mol
pH	-	potencial hidrogeniônico
KCl	-	cloreto de potássio
MgCl ₂	-	cloreto de magnésio
pmoL	-	pico mol
5'	-	extremidade inicial da fita de DNA
3'	-	extremidade final da fita de DNA
kb	-	Kilobases

SUMÁRIO

PREFÁCIO	13
CAPÍTULO I: DELINEAMENTO DA DISSERTAÇÃO	14
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1 LEVEDURAS NEGRAS.....	19
3.2 CROMOBLASTOMICOSE	20
3.2.1 Epidemiologia da Cromoblastomicose.....	23
3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS NO AMBIENTE	25
3.3.1 Sonda Cadeado e RCA	28
4 REFERENCIAS	31
CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Fonsecaea pedrosoi</i> EM AMOSTRAS AMBIENTAIS POR SONDA CADEADO BASEADO EM AMPLIFICAÇÃO EM CÍRCULO ROLANTE (RCA)	39
1 RESUMO	41
2 ABSTRACT	41
3 INTRODUÇÃO	42
4 MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1 ÁREA DE ESTUDO, AMOSTRAGEM E LINHAGENS ESTUDADAS	44
4.2 ISOLAMENTO	45
4.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	45
4.3.1 Extração de DNA.....	45
4.3.2 Sequenciamento e análise filogenética	46
4.3 SONDA CADEADO BASEADO EM RCA NA DETECÇÃO DE <i>F. pedrosoi</i> , EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	46
4.3.1 Extração do DNA total de amostras ambientais.....	46
4.3.2 Reação de ligação da sonda cadeado e RCA	49
4.3.3 Limite de detecção e especificidade	49
4.3.5 Re-isolamento das amostras positivas	51
5 RESULTADOS	51

5.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS	51
5.2 DETECÇÃO DE <i>F. pedrosoi</i> EM AMOSTRAS AMBIENTAIS.....	53
4.2.1 Sensibilidade e Especificidade	54
4.2.2 Re-isolamento por método de cultura.....	55
6 DISCUSSÃO	55
7 CONCLUSÃO.....	57
CAPÍTULO III- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	63
REFERENCIAS	65

PREFÁCIO

Este estudo apresenta-se dividido em três capítulos.

No Capítulo I foram abordados os itens contextuais, ou seja, uma introdução geral seguida pelos os objetivos seguidos de uma revisão literária, que aborda os principais aspectos sobre leveduras negras, cromoblastomicose e epidemiologia da doença e caracterização molecular de fungos no ambiente, especialmente o método de sonda cadeado aliado a amplificação em círculo rolante (RCA).

No Capítulo II, o método de sonda cadeado aliado a amplificação em círculo rolante (RCA) foi apresentado como ferramenta de detecção de *F. pedrosoi* no DNA total de amostras ambientais.

No Capítulo III encontram-se as considerações gerais e perspectivas futuras, encerrando com a lista de referências gerais deste estudo.

CAPÍTULO I: DELINEAMENTO DA DISSERTAÇÃO

1- INTRODUÇÃO GERAL

Leveduras negras são micro-organismos pertencentes ao reino Fungi, classificados na ordem Chaetothyriales, de crescimento lento e devido à presença de melanina nas células vegetativas e reprodutivas, apresentam coloração negra (TEIXEIRA et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al., 2014). Estão presentes no ambiente como sapróbios em substratos como o solo, madeira, plantas em decomposição, resíduos tóxicos e poluentes diversos (WALKER, MCGINNIS; 2014; SEYEDMOUSAVI et al., 2013; TORRES-GUERRERO et al., 2012; NIMRICHTER et al., 2005). Algumas espécies atuam como reais patógenos, outras como oportunistas em humanos e animais enquanto outras apresentam potencial biotecnológico como a assimilação de compostos tóxicos (TEIXEIRA et al., 2017; BLASI et al., 2016; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; BADALI et al. 2008; SANTOS et al. 2007).

Espécies da família Herpotrichiellaceae, são agentes de infecção subcutânea rara e crônica, nodular, de expansão lenta, com resposta imune granulomatosa e formação de células muriformes denominada de cromoblastomicose (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; WALKER; MCGINNIS; 2014). O diagnóstico da doença ocorre por microscopia direta, cultura, exame histopatológico e análise molecular (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; ANDRADE et al., 2007). O tratamento requer administração de antifúngicos em longo prazo, por vezes sendo necessária a cirurgia, termoterapia e quimioterapia, ou a combinação destes (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012; BONIFAZ; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ; PERUSQUÍA-ORTIZ, 2010; SANTOS et al., 2007).

A cromoblastomicose ocorre quase que exclusivamente em pacientes imunocompetentes, e espécies clinicamente relevantes estão em gêneros como *Exophiala*, *Cyphellophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* e principalmente *Cladophialophora* e *Fonsecaea* (TORRES-GUERRERO et al., 2012; QUEIROZ-TELLES et al., 2009). Não há relação entre um único agente etiológico e um padrão clínico da doença, mas sabe-se que espécies do gênero *Cladophialophora* estão restritas a climas áridos enquanto em áreas tropicais e subtropicais quentes e úmidas, a doença é associada a espécies dos gêneros *Fonsecaea* e *Phialophora* (GOMES et al., 2016; DE HOOG et al., 2007; DE HOOG et al., 2004). Quatro espécies do gênero *Fonsecaea* são consideradas patogênicas para o homem *F. pedrosoi* e *F. nubica* prevalentemente agentes de cromoblastomicose, e *F. monophora* e *F. pugnacius* que podem apresentar disseminação no sistema nervoso central e outros órgãos (AZEVEDO et al., 2015; VICENTE et al., 2014; NAJAFZADEH et al., 2011; NAJAFZADEH et al. 2010). A doença é obíqua, porém regiões endêmicas estão estabelecidas

em climas tropicais e subtropicais, como a América Latina (BRUN et al.; 2015; NAJAFZADEH et al., 2011). No Brasil, a infecção tem alta prevalência (1/196 mil habitantes), principalmente no estado Maranhão onde já foram relatados casos envolvendo as quatro espécies do gênero *Fonsecaea* (GOMES et al., 2016).

A cromoblastomicose é uma micose de implantação (QUEIROZ-TELLES et al., 2011; QUEIROZ-TELLES et al., 2009) e os dados epidemiológicos da doença demonstram a origem ambiental desta, sendo a infecção frequentemente relatada após a ocorrência de um trauma cutâneo principalmente com espinhos de plantas e/ou lascas de madeira relacionando as espécies patogênicas de leveduras negras a plantas vivas (MARQUES et al., 2006; SALGADO et al., 2004). Entretanto, o isolamento das espécies clínicas está associado a substratos como material em decomposição, enquanto que os isolados de plantas vivas são espécies diferentes proximamente relacionadas aos agentes de cromoblastomicose (VICENTE et al., 2014; VICENTE et al., 2008).

A recuperação de fungos no meio ambiente ocorre por meio de técnicas de isolamento seletivo, obtenção de colônias e caracterização morfológica das linhagens (TEHRANI, 2014; VAN ELSAS; BOERSMA, 2011). Entretanto a identificação de leveduras negras por critérios morfológicos é extremamente difícil, devido aos baixos níveis de diferenciação morfológica entre as espécies e gêneros e ciclo de vida complexos (IRINYI et al., 2016; VICENTE et al., 2014; HEINRICHS; DE HOOG; HAASEA, 2012).

A espécie *F. pedrosoi* é o agente etiológico mais frequente relacionado à cromoblastomicose (DE HOOG et al. 2004; WALKER; MCGINNIS; 2014; FRANZEN et al., 2008), considerada uma espécie altamente clonal e endêmica da América do Sul (SHI et al., 2016; DENG et al, 2015). No estado do Maranhão, os casos clínicos em geral, são associados a *F. pedrosoi*, e sabe-se que a espécie é menos sensível a terapia fúngica, dentre os agentes de cromoblastomicose (AGARWAL et al., 2017). Poucos trabalhos relatam o isolamento da espécie (MARQUES et al., 2006; SALGADO et al., 2004; GEZUELE et al., 1997; RUBIN et al., 1991) e seu habitat ambiental permanece desconhecido.

O isolamento *F. pedrosoi* em espinhos da planta *Mimosa pudica*, após relato de infecção por paciente foi relatado por Salgado et al., (2004), através de caracterização morfológica das linhagens. A similaridade entre espécies clínicas e ambientais firma a insuficiência de dados que confirmem a relação dos agentes etiológicos da cromoblastomicose e plantas vivas.

Para elucidação desses aspectos epidemiológicos são necessários métodos de isolamento eficazes na recuperação de agentes patogênicos do ambiente e/ou técnicas

baseadas na identificação molecular de genes e sequências específicas do genoma das espécies envolvidas, com alta especificidade, sensibilidade e aplicabilidade em amostras ambientais (TSUI et al., 2011; SUN et al., 2010). Marcadores moleculares são ferramentas úteis, na caracterização do habitat natural das espécies clínicas, apresentam-se com alta especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade, e através do isolamento do DNA total de amostras ambientais permitem a avaliação geral da diversidade, contribuindo para a taxonomia, classificação, inferência filogenética, delimitação de espécies e identificação de fungos (IRINYI et al., 2015; TEHRANI, 2014; VAN ELSAS; BOERSMA 2011; SUN et al., 2010). Sondas cadeado, por exemplo, são oligonucleotídeos com cerca de 100 bp que reconhecem sequências adjacentes no DNA alvo com aplicação na genotipagem de mutações pontuais únicas em grandes populações (por exemplo > 500 indivíduos) (TSUI et al., 2011; ATKINS; CLARK, 2004; NILSSON et al., 1994) e aliado a amplificação em círculo rolante (RCA) são aplicáveis em estudos ambientais (NAJAFZADEH et al., 2011; TSUI et al., 2011).

Neste contexto, é de fundamental importância mapear as regiões endêmicas e elucidar o nicho ecológico das espécies de interesse clínico, a fim de esclarecer aspectos epidemiológicos da doença (HEINRICHS; HOOG; HAASEA, 2012). Assim, este estudo teve por objetivo a caracterização molecular por meio de sonda cadeado aliado a RCA, como ferramentas úteis na caracterização dos agentes de cromoblastomicose em substratos ambientais e por meio de isolamento seletivos a recuperar as espécies de interesse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a presença de *F. pedrosoi* em substratos ambientais como planta, material em decomposição e solo através de seleção por sonda molecular e isolamento.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos negros em substratos ambientais como planta, material em decomposição e solo por isolamento seletivo;
- Identificar leveduras negras de interesse clínico por análise morfológica e molecular;
- Avaliar a sonda cadeado aliado a RCA como método de identificação da ocorrência ambiental de *F. pedrosoi*, por análise do DNA total de amostras de plantas e substratos ambientais;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LEVEDURAS NEGRAS

Leveduras negras é um grupo limitado da ordem Chaetothyriales conhecidos por sua plasticidade morfológica, diversidade assexuada e habitats divergentes (TEIXEIRA et al., 2017). Esses fungos exibem uma variação ecológica complexa, presentes em condições adversas e extremas, como rochas, clima árido e quente, nichos tóxicos e como patógenos oportunistas (TEIXEIRA et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al., 2014). A ordem pode ser dividida em três grupos ecológicos, o primeiro formado por indivíduos saprófitos que ocasionam distúrbios assintomáticos em vertebrados, o segundo são agentes que causam doença e podem ser isolados a partir do ambiente e o terceiro é composto por patógenos altamente virulentos que exigem um hospedeiro humano para se desenvolver (SEYEDMOUSAVI et al., 2013).

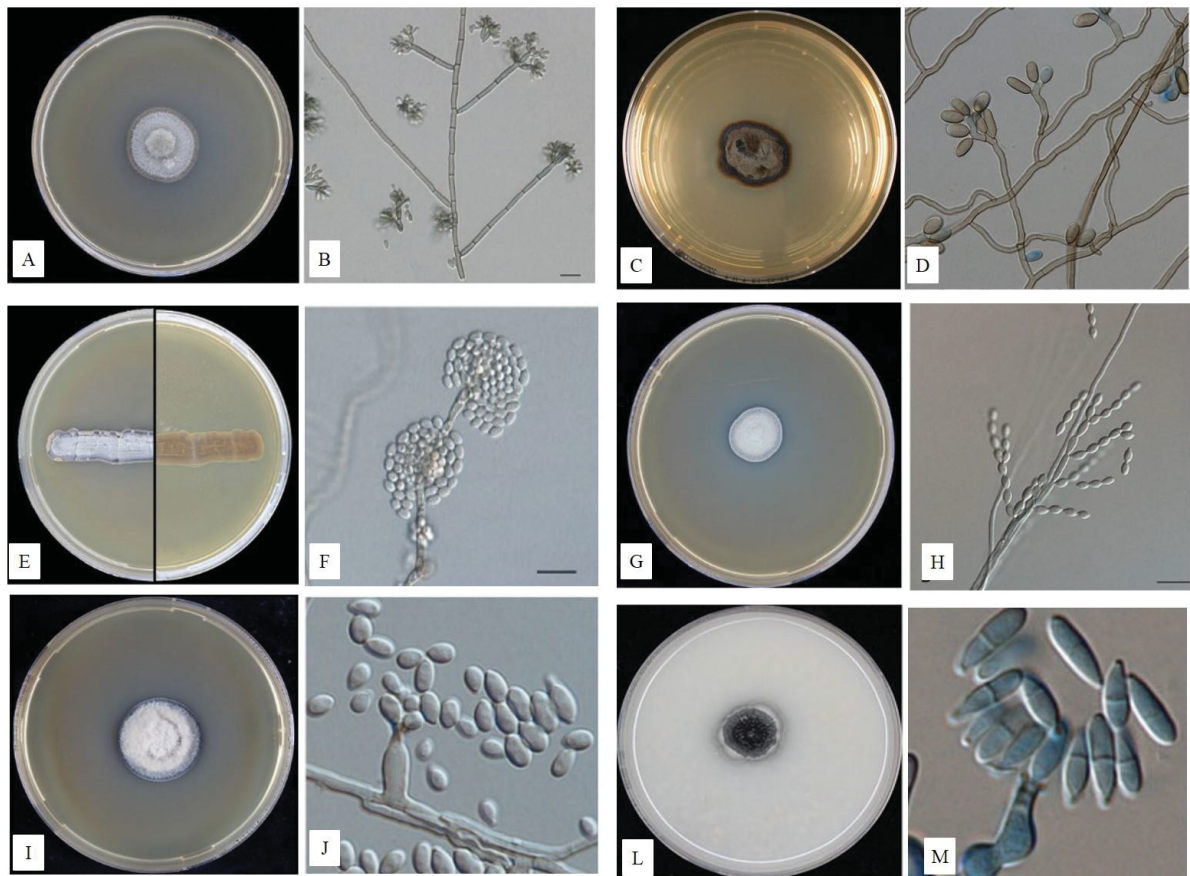
A família Herpotrichiellaceae compreende organismos envolvidos em infecções persistentes que acometem animais e humanos (DENG et al., 2015). As principais espécies clínicas pertencem aos gêneros *Exophiala*, *Cladophialophora*, *Cyphellophora*, *Fonsecaea*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* (FIGURA 1) (TEIXEIRA et al., 2017; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A presença de caroteno, paredes espessas, diferenciação em células muriformes, fases leveduriforme, osmotolerância, adesão, hidrofobicidade, assimilação de hidrocarbonetos aromáticos, produção de sideróforos e melanina são importantes fatores de virulência compartilhados pelo grupo (WALKER; MCGINNIS; 2014; VICENTE et al., 2012). Constituída de biopolímeros fenólicos, a melanina é uma molécula importante na eliminação de radicais livres que interagem com antifúngicos impedindo que estes atinjam seu local alvo, absorção de luz UV, proteção contra lise enzimática, dessecação e resistência a variações extremas de temperatura (FRANZEN et al., 2008; SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

As espécies apresentam ecologia dupla, exibindo perfil biotecnológico quando na degradação de hidrocarbonetos e perfil patogênico quando em tecido hospedeiro (BLASI et al., 2016). Apesar de pouco relatados na patologia humana, as leveduras negras são o único grupo de patógenos envolvidos em diversas infecções persistentes que acometem pacientes imunocompetentes e imunodeprimidos (SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

As doenças causadas por estes organismos são micetoma, uma infecção dos tecidos profundos, caracterizada pela presença de grânulos micóticos; feohifomicose, presença de hifas septadas e estruturas de reprodução de coloração escura, no tecido hospedeiro e

cromoblastomicose uma infecção subcutânea rara e crônica, caracterizada pela presença de células muriformes (TEIXEIRA et al., 2017; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; WALKER; MCGINNIS, 2014). Não há relação entre um único agente etiológico e um padrão clínico, podendo a mesma espécie estar associada à feohifomicose ou cromoblastomicose, apresentando manifestações clínicas variáveis, de forma local ou disseminada, afetando vários órgãos como pulmões, pele, nódulos linfáticos, ossos e sistema nervoso central (VICENTE et al., 2012; HARRIS et al., 2009).

FIGURA 1- MORFOLOGIA DAS LEVEDURAS NEGRAS DA FAMÍLIA HERPOTRICHIELLACEAE.



A e B *Fonsecaea pedrosoi*. C e D. *Rhinocladiella mackenziei*. E e F. *Exophiala dermatitidis*. G e H. *Cladophialophora carrionii*. I e J. *Phialophora verrucosa*. L e M. *Cyphellophora pluriseptata*. FONTE: Adaptado de De Hoog et al. (2014).

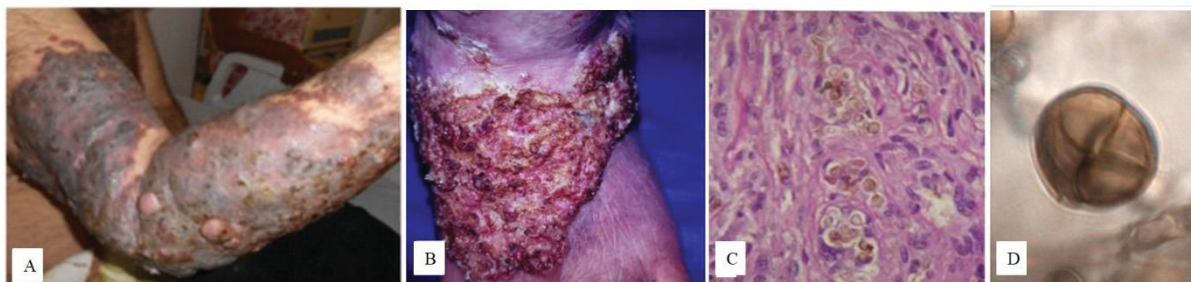
3.2 CROMOBLASTOMICOSE

A cromoblastomicose é uma doença negligenciada, endêmica de regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo que afeta principalmente populações de baixa renda, em áreas remotas e rurais, favelas urbanas ou em zonas de conflito (QUEIROZ-TELLES, 2015). A doença está fortemente ligada a atividade ocupacional agrícola, jardineiros, lenhadores, vendedores de produtos agrícola, que desenvolvem suas atividades sem sapatos de proteção,

luvas ou roupas, fatores que favorecem a infecção por implantação (MARQUES et al., 2015; WALKER, MCGINNIS, 2014) e está associada principalmente a espécies de leveduras negras dos gêneros *Cladophialophora*, *Phialophora* e *Fonsecaea* (BRUN et al., 2015; CHAABANE et al., 2015).

A doença é uma micose cutânea ou subcutânea rara, crônica e progressiva desenvolvida pela inoculação primária de micélios e/ou conídios de leveduras negras que leva à hiperproliferação do tecido hospedeiro, combinada a presença de células muriformes, características da doença (FIGURA 2D) (SINGH, 2003; CHOWDHARY, PERFECT, DE HOOG, 2015; QUEIROZ-TELLES, 2015). O início da infecção é relatado após o rompimento da barreira cutânea, em regiões susceptíveis (membros inferiores e superiores) (FIGURA 2) (WALKER, MCGINNIS, 2014). A cromoblastomicose é assumidamente uma micose de implantação (QUEIROZ-TELLES et al., 2017), pois o relato da inoculação traumática é presente na maioria dos quadros clínicos, sendo que a lesão e proliferação da doença ocorre geralmente em torno da área onde ocorreu a inoculação traumática (BADALI et al., 2010; MARQUES et al., 2015). O tempo decorrente entre a inoculação e o aparecimento da lesão não é conhecido, podendo variar de semanas a meses (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

FIGURA 2- ASPECTOS CLÍNICOS DA CROMOBLASTOMICOSE.



A e B. Aspectos cutâneo da cromoblastomicose; C. Histopatologia de tecido cutâneo evidenciando células acastanhadas. D. Célula muriforme, que caracteriza a infecção. FONTE: Adaptado de Shi et al. (2016); Azevedo et al. (2015); Avelar-Pires et al. (2013); Badali et al. (2008).

O aspecto clínico da doença é altamente diversificado (GONZÁLEZ et al., 2013). As lesões são formadas por placas polimórficas verrucosas, granulomas supurativos, hiperqueratóticas, cicatriciais, microabscessos e raramente granulomas tuberculóides e hiperplasias, crônicas e persistentes sem tendência à cura espontânea (BRUN et al., 2015; PIRES et al., 2013; SANTOS et al., 2007; NIMRICHTER et al., 2005). De acordo com a gravidade, as manifestações clínicas são classificadas em leve, moderada e grave, cada qual com resposta distinta ao tratamento (QUEIROZ-TELLES et al., 2009). A doença não é

contagiosa e apesar de indolor, alguns pacientes relatam pruridos, dor e sensação de queimação (DENG et al, 2015; MARQUES et al., 2015). Alterações fibróticas e linfáticas ocasionam complicações secundárias como linfedema, sintomas semelhantes à elefantíase e a auto inoculação ocorre pelo prurido intenso, muitas vezes associado à infecções bacterianas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SANTOS et al., 2007).

A susceptibilidade genética pode estar associada a adaptações dos agentes etiológicos ao hospedeiro, uma vez que muitos pacientes em áreas endêmicas desenvolvem resposta humoral específica, que não foi totalmente elucidada (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; ESTERREA, QUEIROZ-TELLES, 2006). A resposta imunológica humoral não confere proteção contra infecções causadas por leveduras negras, mas sabe-se que durante a infecção a presença de anticorpos IgM permanece elevada, caracterizando o desenvolvimento lento do fungo e a os altos níveis de anticorpos anti-melanina, interferem na ação do sistema complemento, conferindo resistência a antifúngicos (TORRES-GUERRERO et al., 2012; SANTOS et al., 2007).

O diagnóstico da doença é realizado por microscopia direta, cultura, exame histopatológico evidenciando a presença de corpos muriformes de coloração marrom, tamanho de 5-12 mm e forma arredondada, paredes espessas com a formação de septos biplanares (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; SANTOS et al., 2007). Técnicas sorológicas, ensaios intradérmicos e métodos moleculares de identificação de espécie, não são usuais na rotina clínica, mas são métodos acurados de diagnóstico laboratorial (WALKER, MCGINNIS, 2014 TORRES-GUERRERO et al., 2012). A identificação em nível de espécie é clinicamente importante devido às diferenças no prognóstico da infecção e variação no perfil de susceptibilidade dos antifúngicos conforme a espécie em questão (GOMES et al., 2016; HARRIS et al., 2009).

Os sinais clínicos e a característica das lesões da doença podem ser confundidos com outras infecções fúngicas como paracoccidioidomicose, blastomicose, coccidioidomicose, feohifomicose, esporotricose; infecções bacterianas como a tuberculose cutânea, lepra, sífilis terciária, micobacterioses causadas por espécies do gênero *Mycobacterium*; infecções parasitárias como leishmaniose e rinosporidiose e doenças não infecciosas como carcinoma ou lúpus eritematoso (QUEIROZ-TELLES; SANTOS, 2012). A cromoblastomicose é de difícil tratamento devido à característica resistente, podendo ocorrer em formas clínicas severas (DENG et al, 2015). A administração de itraconazol é a terapia padrão para a doença (HEIDRICH et al., 2017). A positividade sorológica pode perdurar por longos períodos após o tratamento devido à resposta limitada da doença a fármacos antimicóticos de baixa eficácia

em longo prazo (SANTOS et al., 2007; NIMRICHTER et al., 2005). A desistência do paciente ao tratamento é comum devido ao longo período de administração de medicamentos caros e que apresentam toxicidade celular, o que acarreta em reaparecimento das lesões ativas nas mesmas regiões anatomicas (HEIDRICH et al., 2017). O tratamento é dependente do agente etiológico, forma clínica e a gravidade das lesões (DENG et al, 2015).

3.2.1 Epidemiologia da Cromoblastomicose

Embora considerada uma doença onipresente, a maior incidência está relacionada aos trópicos, regiões de clima tropical e subtropical como a América Latina (BRUN, et al., 2015). O clima, quente e úmido e a alta disponibilidade de nutrientes propiciam o ambiente adequado para o desenvolvimento de fungos, incluindo leveduras negras (CHAABANE et al., 2015; TORRES-GUERRERO et al., 2012). Países endêmicos para a doença são Madagascar, Japão, China, México, Brasil, Costa Rica, Porto Rico, Cuba e Venezuela (CHAABANE et al., 2015; TORRES-GUERRERO et al., 2012; DE HOOG et al., 2004). Em regiões quentes e úmidas a doença está frequentemente associada à espécie *Fonsecaea* e vegetação de palmeiras enquanto *Cladophialophora* tem ocorrência mais restrita em climas áridos, relacionado à vegetação Cactaceae (GOMES et al., 2016; DE HOOG et al., 2007).

A cromoblastomicose não é comum no continente Europeu; na África a doença é prevalente em Madagascar e África do Sul; na Ásia, o Japão apresenta 10 casos por ano com incidência de 01 caso/416.000 pessoas, e junto com a China são as consideradas áreas endêmicas do continente (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; YANG et al., 2012). Na América Latina a doença só não foi relatada ainda no Chile, e países como a Venezuela, a frequência de casos de cromoblastomicose é de 16 casos/1.000 pessoas (DENG et al, 2015).

No Brasil, a região norte apresenta 872 casos relatados da doença, com incidência média anual de 4,3/ano para o estado do Maranhão e 5,9/ano para o Pará, enquanto que na região sul, no estado do Paraná a incidência média anual é de 6,4/ ano e 2,6 / ano para o Rio Grande do Sul (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). A infecção prevalece em trabalhadores rurais, homens, com idade média de 59 anos, residentes em áreas rurais (MARQUES et al., 2015). As regiões anatômicas mais susceptíveis a infecção são membros inferiores e superiores, enquanto o tronco, nariz, orelha, pálpebras, ombros e nádegas são regiões anatômicas menos comuns QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

No estado do Maranhão a infecção apresenta prevalência estimada de 01 caso/196 mil habitantes, onde já foram relatados casos envolvendo as quatro espécies do gênero *Fonsecaea*

(*F. pedrosoi*, *F. nubica*, *F. monophora* e *F. pugnacius*) (GOMES et al., 2016). O extrativismo associado a espécies de palmeiras, como a do coco babaçu (*Orbygnia phalerata*) é um agravante para o endemismo da doença na região Norte (QUEIROZ-TELLES et al., 2017; MARQUES et al., 2006). O isolamento *F. pedrosoi* em espinhos da planta nativa da região norte, *Mimosa pudica*, após relato de infecção por paciente, foi reportado Salgado et al., (2004), através de caracterização morfológica das linhagens, demonstrando a epidemiologia ambiental desta. Entretanto, a similaridade entre espécies clínicas e ambientais, firma a insuficiência dos dados em estabelecer a relação dos agentes etiológicos da cromoblastomicose com plantas vivas (VICENTE et al., 2014; VICENTE et al., 2008; DE HOOG et al., 2007). O nicho natural das espécies de leveduras negras ainda não está totalmente elucidado (DE HOOG et al., 2004; VICENTE et al., 2014), bem como a maneira como pacientes sintomáticos adquirem a infecção, que é assumida como decorrente da inoculação traumática (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

3.2.2 *Fonsecaea* spp. e Cromoblastomicose

O gênero *Fonsecaea*, compreende organismos sapróbios, que apresentam colônias de crescimento lento, aspecto aveludado e coloração negra ou castanha escuro, conídios amplamente clavados e as hifas apresentam-se regulares, melanizados e ramificadas na parte apical (WALKER, MCGINNIS; 2014; TORRES-GUERRERO et al., 2012; SANTOS et al.; 2007; NIMRICHTER et al., 2005). Possuem três fases morfológicas distintas, os conídios são estruturas de reprodução assexuada, quando encontrados como saprófitas estão sob a forma de micélio e os corpos muriformes são as formas parasitárias (SANTOS et al., 2007; NIMRICHTER et al., 2005).

No Brasil, em 1911, foi relatado o primeiro caso de *F. pedrosoi*, como único agente de cromoblastomicose do gênero, por Moraes Pedroso (AZEVEDO et al., 2015). Em 2005, análises moleculares mostraram que muitos dos isolados clínicos de *F. pedrosoi* eram uma nova espécie, descrita como *F. monophora*, e recentemente uma nova espécie foi descrita, *F. nubica* (TORRES-GUERRERO et al., 2012; NAJAFZADEH et al., 2010). Atualmente sabe-se que *F. pedrosoi* é considerada uma espécie altamente clonal e endêmica da América do Sul, enquanto *F. nubica* apresenta distribuição global e *F. monophora* apresenta-se em expansão clonal na América do Sul e na Ásia, prevalente no sul da China (SHI et al., 2016; DENG et al, 2015).

A espécie *F. pedrosoi* é a mais frequente relacionado à cromoblastomicose (WALKER; MCGINNIS; 2014; FRANZEN et al., 2008; DE HOOG et al. 2004), entretanto as espécies do gênero *Fonsecaea* são morfologicamente indistinguíveis, nem todos os casos apresentam crescimento do patógeno e as espécies diferem entre si por não serem igualmente eficientes a desenvolver a doença (AZEVEDO et al., 2015; VICENTE et al., 2014; NAJAFZADEH et al. 2010). As espécies *F. pedrosoi* e *F. nubica* são patógenos relacionados unicamente com a cromoblastomicose enquanto *F. monophora* tem espectro clínico diversificado (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). *F. pugnacius* mostrou ser uma espécie capaz de colonizar a região cutânea e causar infecção cerebral concomitantemente em um mesmo paciente, considerado um patógeno exclusivamente humano (AZEVEDO et al., 2015). Entretanto, espécies ambientais como *F. erecta* são potencialmente capazes de infectar hospedeiros animais com lesões caracterizadas por edema, enquanto que *F. pedrosoi* desenvolve característica de cronicidade com desenvolvimento de placas escuras (VICENTE et al., 2017).

Não é claro se a forma infectante de *F. pedrosoi* é dada por conídios ou hifas uma vez que hifas e células muriformes do fungo são capazes de estabelecer cromoblastomicose em modelo murinho o que não acontece com conídios (SIQUEIRA et al., 2017). A mudança morfológica de conídios a corpos muriformes ocorre no hospedeiro (SANTOS et al., 2007). A cura é variável de acordo com os agentes causadores, gravidade das lesões e terapia, sendo *F. pedrosoi* espécie menos sensível a terapia fúngica, dentre os agentes de cromoblastomicose (AGARWAL et al., 2017).

3.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE FUNGOS NO AMBIENTE

A detecção direta de fungos de amostras ambientais é um desafio, uma vez que diferentes genótipos e linhagens de fungos patogênicos podem coexistir numa gama de substratos apresentando diferentes perfis patogênicos e níveis de virulência, exercer várias interações com os habitats e apresentarem-se em concentrações muito baixas (HAMZEHEI et al., 2013; TSUI et al., 2011; SUN et al., 2010; ANDRADE et al., 2007). Em geral, estudos que caracterizam os micro-organismos encontrados no meio ambiente são realizados por métodos como isolamento, obtenção de colônias e caracterização morfológica e molecular apenas de fungos cultiváveis (TEHRANI et al., 2014; VAN ELSAS, BOERSMA, 2011). Métodos convencionais apresentam limitações que não possibilitam a caracterização completa dos microorganismos que compõe determinado nicho, assim técnicas baseadas em

caracterização de ácidos nucleicos, demonstram maior sensibilidade e especificidade com aplicação em estudos ambientais (HAMZEHEI et al., 2013; LACKNER et al., 2012; TSUI et al., 2011; VAN ELSAS, BOERSMA, 2011; ANDRADE et al., 2007;).

A hibridização fluorescente “in situ” (FISH), é um método baseado no reconhecimento da sequência de DNA, capaz de distinguir micro-organismos metabolicamente ativos (TSUI et al., 2011). Inicialmente o material é fixado e imobilizado em uma membrana e posteriormente hibridizados em lâmina de vidro com uma sonda que emite sinal de fluorescência, visualizados por microscopia (EICKHORST, TIPPKOTTER, 2008; BERTAUX et al., 2007). A especificidade do método está associada a sonda molecular (15-30 nucleotídeos), capaz de reconhecer domínios gênicos que permitem identificar diferentes níveis filogenéticos, considerada uma importante ferramenta em estudos filogenéticos, ecológicos, diagnósticos e caracterização ambiental de microorganismos como fungos e bactérias (CARACCIOLO; BOTTONI; GRENNI, 2014; EICKHORST, TIPPKOTTER, 2008; BERTAUX et al., 2007). As limitações de FISH estão relacionadas a permeabilidade insuficiente da parede da célula, as sondas não específicas aos substratos fluorescentes (TSUI et al., 2011).

Ensaios de hibridização de matriz de DNA consistem na hibridização de regiões gênicas por sondas fluorescentes, dispostas sobre uma plataforma sólida (CHO, TIEDJE, 2002; KEHOE, VILLAND, SOMERVILLE, 1999). O método é capaz de detectar microorganismos específicos em substratos ambientais, sem a necessidade de cultura prévia (TSUI et al., 2011), como bactérias indicadoras de emissão de óxido nitroso, no solo (MCGRATH et al., 2010). As vantagens do método são a capacidade de acomodar sondas distintas, capaz de detectar patógenos de gêneros diferentes em um mesmo ensaio e a reutilização da matriz (TSUI et al., 2011; FESSEHAIE, DE BOER, LÉVESQUE, 2003)

A amplificação de domínios gênicos é uma ferramenta importante para estudos aplicados a detecção, monitoramento e identificação de espécimes (LIBERT et al., 2016; NOTOMI et al., 2000). Em fungos, a região conhecida como espaçador transcrito interno é considerado filogeneticamente variável para ser utilizado como fonte de informações taxonômicas que permitem a identificação fúngica (SIBLEY, PEIRANO, CHURCH, 2012). O gene espaçador interno transcrito (ITS) foi proposto por Irinyi et al., (2015) como código de barras para identificação gênica de fungos patogênicos. A validação da região é devido a sua reprodutibilidade, sensibilidade e especificidade, que permite o discernimento de espécies da maioria dos táxons fúngicos, além da disponibilidade de primers universais (AHMED et al., 2014; WHITE et al., 1990) e a estrutura em múltiplas cópias no genoma que possibilita uma

eficiência na amplificação também em amostras ambientais que apresentam baixa taxa de DNA (IRINYI et al., 2015; HEINRICHS, DE HOOG, HAASEA, 2012).

A PCR continua sendo o método mais utilizado de amplificação de ácidos nucleicos e aliado ao sequenciamento de DNA tem sido o "padrão-ouro" para identificação molecular de fungos cultiváveis, por se tratar de um método rápido e preciso (TSUI et al., 2011). A técnica de PCR em tempo real combina a detecção do DNA alvo com a quantificação da amplificação de um produto, caracterizada pelo aumento do sinal fluorescente liberado após a hibridização, sendo sua especificidade associada ao desenho dos iniciadores utilizados na reação (SMITH, OSBORN, 2009; DEEPAK et al., 2007). É considerada uma ferramenta robusta na detecção de fitopatógenos na planta hospedeira e no solo (LIEVENS et al., 2006) ou de patógenos clínicos como *Candida* spp. e *Aspergillus* spp., frequentemente isolados no ambiente (SOMOGYVARI et al., 2012). O método de Nested-PCR é baseado na amplificação de genes de interesse por PCR em duas etapas, a primeira realiza a amplificação total gene alvo, e a segunda etapa é realizada com a aplicação de iniciadores específicos concebidos a partir de regiões de polimorfismos gênicos que permitem a identificação de apenas uma espécie (WILCZYNSKI, 2009). O método é aplicável a detecção de fitopatógenos a partir do DNA total da planta hospedeira (YANG et al., 2017) e sua sensibilidade é capaz de caracterizar patógenos clínicos de difícil cultivo como *Histoplasma capsulatum* em amostras de solo (NORKAEW et al., 2013).

Entretanto, embora a PCR seja uma estratégia rápida e precisa na detecção de fungos ambientais, a técnica apresenta limitação devido à presença de certas substâncias que quando presentes inibem as reações ou acarretam em resultados falsos positivos (LIBERT et al., 2016; TSUI et al. 2011). Técnicas isotérmicas de amplificação de DNA, são apontadas como ferramentas promissoras em análises ecológicas (TEHRANI et al., 2014; DE PAZ, BROTONS, MUNHÖZ ALMAGRO, 2014) pois oferecem maior sensibilidade e especificidade, maior tolerância a componentes inibitórios, resultados confiáveis em curto períodos de tempo, capacidade de processamento de DNA sem purificação prévia, reduzindo custos e tempo (DE PAZ, BROTONS, MUNHÖZ ALMAGRO, 2014).

A amplificação isotérmica mediada por laço (LAMP) é um método isotérmico que permite a detecção de sequências de DNA alvo sem sequenciamento ou amplificação por PCR (DENG et al., 2014). A sensibilidade da reação não é afetada pela presença de DNA não alvo, nem por inibidores de PCR, desenvolvida para detecção rápida de fungos patogênicos no ambiente, diagnóstico clínico e estudos retrospectivos em amostras clínicas arquivadas (SUN et al., 2010). Entretanto, o método de amplificação em círculo rolante (RCA) foi proposto

como uma ferramenta específica de amplificação, devido a técnica estar aliada à aplicação de um oligonucleotídeo circularizável (ZOU et al., 2012; NAJAFZADEH et al., 2011). LAMP é considerado um método mais sensível enquanto RCA é considerada uma ferramenta mais específica, ambas com aplicabilidade em estudos ambientais (NAJAFZADEH et al., 2011; SUN et al., 2010).

3.3.1 Sonda Cadeado e RCA

Sondas cadeado são oligonucleotídeos circularizáveis com aproximadamente 100 bp que reconhecem sequências adjacentes no DNA alvo (NILSSON et al., 1994), aplicados na genotipagem em grandes populações (>500 indivíduos) (TSUI et al., 2011; BAKHT, QI, 2005; ATKINS, CLARK, 2004), pois não ocorre reação cruzada sonda com sonda, falsos positivos (ANTSON et al., 2000). A especificidade da sonda é determinada pela estrita complementariedade de ambas as extremidades da sonda com a molécula alvo desenhada em regiões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) (FIGURA 2B) (HAMZEHEI et al., 2013; DAVARI et al., 2012; LACKNER et al., 2012; ANTSON et al., 2000).

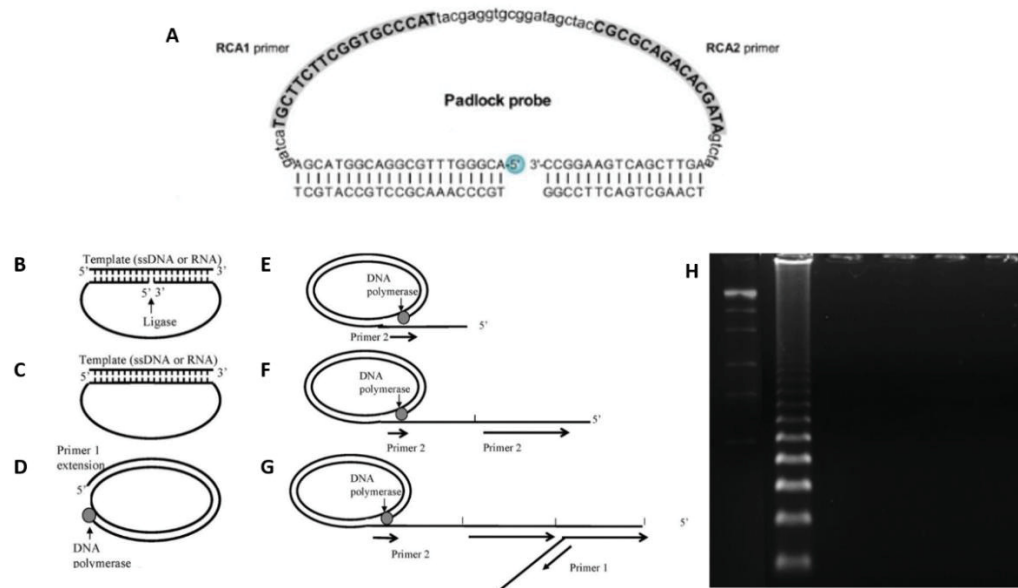
As regiões de SNPs são locais onde são observadas diferenças únicas em nucleotídeos das sequências de DNA dos indivíduos de uma população que surgem devido a transições (C/G, A/T, C/A e T/G), transições (C/T ou G/A), inserções e deleções, criando variação entre o genoma dos organismos (SINGH, GUPTA, 2017; BRUMFIELD et al., 2003). São considerados marcadores moleculares aplicáveis na identificação das espécies e estudo da relação genética entre indivíduos, uma vez que comparados o mesmo trecho de DNA para dois ou mais indivíduos, os SNPs são as diferenças mais observadas em nucleotídeos (FORCHE et al., 2004; BRUMFIELD et al., 2003).

Devido à alta especificidade, sondas cadeado se sobressaem a PCR por não apresentarem limitações como, detecção de numerosas sequências alvo, detecção localizada e redução de contaminação cruzada (ANTSON et al., 2000). A formação de uma molécula firmemente fechada pela ação de uma DNA ligase, só ocorre após o pareamento exato das bases da sonda ao molde de DNA, sendo este produto de ligação, pode ser amplificado, aumentando a sensibilidade da reação, por técnicas isotérmicas como RCA, com limite de detecção inferior a 10 cópias (NILSSON et al., 1994; ANTSON et al., 2000; NOTOMI et al., 2000).

Amplificação em círculo rolante (RCA) baseia-se na amplificação e deslocamento do molde de DNA, a partir da ligação de sondas cadeado (DE PAZ, BROTONS, MUNHÖZ

ALMAGRO, 2014). Após a formação da molécula circular pela enzima DNA Ligase, ocorre a amplificação do sinal pela RCA através do deslocamento da fita sintetizadas pela enzima Bst Polimerase, com aplicação de dois iniciadores simultâneos (FIGURA 3) (ZOU et al., 2012; NAJAFZADEH et al., 2011). Os produtos de amplificação são separados por eletroforese em gel (FIGURA 3H) (LACKNER et al., 2012; NILSON et al., 1994).

FIGURA 3- DESENHO DE SONDA CADEADO, LIGAÇÃO E RCA.



(A). Desenho da sonda cadeado (B). Sonda cadeado hibridizada com sequência alvo de DNA ou ARN. (C). Formação de sonda pela DNA ligase. (D). Amplificação da molécula circular por deslocamento, catalisado pela enzima Bst DNA Polimerase. (E). A sequência amplificada complementar à sonda circular é gerada por RCA, expondo a região de ligação dos iniciadores RCA 1 e RCA 2. (F). Múltiplos eventos de amplificação são iniciados à medida que a sequência original se alonga. (G). À medida que ocorre o deslocamento e sintetização da cadeia de DNA, são liberados novos locais de ligação dos iniciadores. (H). Produto de amplificação visualizado em gel de agarose 2%, padrão de escada positivo. FONTE: Adaptado de Wang et al. (2005); Rodrigues et al. (2015).

A região ITS foi escolhida por Najafzadeh e colaboradores (2011) para desenho de sondas cadeados de *F. pedrosoi*, *F. monophora* e *F. nubica*, por se tratar de uma região informativa na distinção dessas espécies, obtendo 100% de especificidade e sem reações cruzadas na ligação de RCA (IRINYI et al., 2015; NAJAFZADEH et al., 2011; ATKINS, CLARK, 2004). A amplificação por RCA elimina quase a nulo o risco de replicação de sequências inespecíficas, sendo útil na discriminação de espécies estritamente relacionadas

como o gênero *Fonsecaea* (TEHRANI et al., 2014; NAJAFZADEH et al., 2011; TSUI et al., 2011).

Sondas cadeados aliadas ao método de RCA foram avaliadas para identificação espécie específica de *Fusarium graminearum*, e *Sporothrix*, em amostras ambientais, sendo uma ferramenta efetiva na discriminação da espécie de interesse (RODRIGUES et al., 2015; DAVARI et al., 2012). O método é capaz distinguir grupos fúngicos sapróbios, endofíticos e patógenos em amostras ambientais, sem a necessidade de isolamento prévio das culturas, com potencial de aplicabilidade em caracterização de nichos ecológicos, identificação de espécies e estudos epidemiológicos (HAMZEHEI et al., 2013; DAVARI et al., 2012; TSUI et al., 2011).

A utilização de métodos moleculares na identificação de espécies de leveduras negras patogênicas é essencial para entender a ecoepidemiologia da doença e a sonda cadeado desenvolvida para *F. pedrosoi* é um método promissor (NAJAFZADEH et al., 2011). Os marcadores moleculares estudados, são baseados em estudos genômicos comparativos entre as espécies (VICENTE et al., 2017) ou ainda por técnicas baseadas em regiões de mutações de ponto único no genoma das espécies (NILSON et al., 1994), suportando a caracterização molecular das espécies de interesse, independente de cultura. O ensaio de RCA permite a caracterização de espécies mesmo amostras complexas, além do método se sobressair as demais técnicas disponíveis, devido a sua especificidade decorrente da combinação entre o reconhecimento do DNA alvo por um oligonucleotídeo circularizável a uma amplificação isotérmica do sinal, que possibilita a visualização de padrões positivos, mesmo quando o DNA de interesse está disponível em concentrações baixas (FURUIE et al. 2016; RODRIGUES et al., 2015; NAJAFZADEH et al., 2011).

Em síntese, a cromoblastomicose é uma micose de implantação, crônica e de espectro clínico variável, frequente em trabalhadores rurais em áreas endêmicas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Os aspectos clínicos da doença são amplamente estudados (AZAVEDO et al., 2015; QUEIROZ-TELLES et al., 2011, SANTOS et al., 2007), porém os dados sobre a ecoepidemiologia dos agentes são restritos a poucos estudos (VICENTE et al., 2001, 2008, 20014; SALGADO et al., 2007; MARQUES et al., 2006). A disponibilidade de técnicas robustas baseadas em estudos moleculares contribui no entendimento dos aspectos clínicos da doença bem como o nicho ocupado pelos dos agentes de infecção em seu habitat natural (TSUI et al., 2011). O método de RCA aliado a sonda cadeado é uma ferramenta sensível na caracterização dos agentes de cromoblastomicose no ambiente contribuindo na ecoepidemiologia da doença, que ainda não foi completamente elucidada.

4 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.; SINGH, G.; GHOSH, A.; VERMA, K. K.; PANDEY, M., XESS, I. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 cases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, p. 1-13, 2017.
- AHMED, S.A.; GERRITS VAN DEN ENDE, B.H.G.; FAHAL, A. H.; VAN DE SANDE, W.W.J.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of black grain eumycetoma causative agents using rolling circle amplification. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e3368, 2014.
- ANDRADE, T.S.; CURY, A.E.; CASTRO, L.G.M.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 267-272, 2007.
- ANTSON, D.O.; ISAKSSON, A.; LANDEGREN, U.; NILSSON, M. PCR-generated padlock probes detect single nucleotide variation in genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. e58, 2000.
- ATKINS, S.D.; CLARCK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n.1, p.3-15, 2004.
- AVELAR-PIRES, C.; SIMOES-QUARESMA, J.A.; MACEDO, G.M.M.; XAVIER, M.B.; BRITO, A.C. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the Brazilian amazon region. **Archives of Medical Research**, v. 44, p.302-306, 2013.
- AZEVEDO, C.M.P.S.; GOMES, R.R.; VICENTE, V.A.; SANTOS, D.W.C.L.; MARQUES, S.G.; NASCIMENTO, M.M.F.; ANDRADE, C.E.W.; SILVA, R.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, G.S. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n.8, 2015.
- BADALI, H.; BONIFAZ, A.; BARRÓN-TAPIA, T.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; ESTRADA-AGUILAR, L.; OLIVEIRA, N.M.C.; FILHOS, J.F.S.; GUARRO, J., MEIS, J.F.G.M.; DE HOOG, G.S. *Rhinocladiella aquaspersa*, proven agent of verrucous skin infection and a novel type of chromoblastomycosis. **Medical Mycology**, v. 48, p. 696–703, 2010.
- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M.J.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE HOOG, G.S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, vol. 61, p. 175–191, 2008.
- BAKHT, S.; QI, X. Ligation-mediated rolling-circle amplification-based approaches to single nucleotide polymorphism detection. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.5, p. 111–116, 2005.
- BERTAUX, J.; GLOGER, U.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; SCHEU, S. Routine fluorescence in situ hybridization in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p.451–460, 2007

BLASI, B.; POYNTNER, C.; RUDAVSKY, T.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; DE HOOG, G.S.; TAFER, H.; STERFLINGER, K. Pathogenic yet environmentally friendly? Black fungal candidates for bioremediation of pollutants. **Geomicrobiology Journal**, v.33, p. 308–317, 2016.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A.M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.8, n.8, p. 619-27, 2010.

BRUMFIELD, R.T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D.A.; EDWARDS, S.W. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.249-256, 2003.

BRUN, S.; ZUMELZU, C.; HOANGANH, M.; LEVY, A.; GARCIA-HERMOSO, D.; LAROCHE, L.; IZRI, A. First case of chromoblastomycosis from Bangladesh. **Medical Mycology**, v.10, p.1–3, 2015.

CARACCIOLO, A.B.; BOTTONI, P.; GRENNI, P. Fluorescence in situ hybridization in soil and water ecosystems: A useful method for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v.92, p.567-579, 2014.

CHAABANE, H.; MSEDDE, M.; CHARFI, S.; CHAARI, I.; BOUDAWARA, T.; TURKI, H. Chromoblastomycose: lésion solitaire du sein. **La Presse Médicale**, v.44, n.7–8, 2015.

CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1425–1430, 2002.

CHOWDHARY, A.; PERFECT, J.; DE HOOG, G. S. Black molds and melanized yeasts pathogenic to humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1-21, 2014.

DAVARI, M.; VAN DIEPENINGEN, A.D.; BADAI-AHARI, A.; ARZANLOU, M.; NAJAFZADEH, M. J.; VAN DER LEE, T.A.J.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, p. 63–70, 2012.

DE HOOG, G.S.; NISHIKAKU, A.S.; FERNANDEZ-ZEPPENFELDT, G.; PADÍN-GONZÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p.219–234, 2007.

DE HOOG, S.G.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V.A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* Species. **Medical Mycology**, v. 42, p. 405-416, 2004.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 4. ed. Utrecht: Universitat Rovira i Virgili, 2014. Disponível em: <http://www.clinicalfungi.org/>. Acesso em: março de 2018.

DEEPAK, S.A.; KOTTAPALLI, K.R.; RAKWAL, R.; OROS, G.; RANGAPPA, K.S.; IWAHASHI, H.; MASUO, Y.; AGRAWAL, G.K. Real-Time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. **Current Genomics**, v.8, p. 234-251, 2007

DE PAZ, H. D.; BROTONS, P.; MUNHÔZ-ALMAGRO, C. Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 14, 827–843. 2014.

DENG, S.; TSUI, C.K.M.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; YANG, L.; NAJAFZADEH, M.J.; BADALI, H.; LI, R.; HAGEN, F.; MEIS, J.F.; SUN, J.; DOLATABADI, S.; PAPIEROK, B.; PAN, W.; DE HOOG, G.S.; LIAO, W. Global spread of human chromoblastomycosis is driven by recombinant *Cladophialophora carrionii* and predominantly clonal *Fonsecaea* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, p.e0004004, 2015.

EICKHORST, T.; TIPPKOTTER, R. Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 1284–1293, 2008.

FESSEHAIE, A.; DE BOER, S.H.; LÉVESQUE, A. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. **Phytopathology**, v.93, n.3, p.262-269, 2003.

FORCHE, A.; MAGEE, P.T.; MAGEE, B.B.; MAY, G. Genome-wide single-nucleotide polymorphism map for *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 705-714, 2004.

FRANZEN, A.J.; CUNHA, M. M. L.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; DA SILVAM.B.; SALGADO,C.G.; SOUZA,W.; ROZENTAL,S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Structural Biology**, v.162, p.75–84, 2008.

FURUIE, J.L.; SUN, J.; DO NASCIMENTO, M.F.; GOMES, R.R.; WACULICZ-ANDRADE, C. E.; SESSEGOLO, G. C.; RODRIGUES, A.M.; GALVÃO-DIAS, M.A.; DE CAMARGO, Z.P.; QUEIROZ-TELLES, F.; NAJAFZADEH, M.; DE HOOG, S.G.; VICENTE, V. A. Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using rolling circle amplification. **Mycoses**, v.59, p.12–19, 2016.

GEZUELE, E.; MACKINNON, J. E.; CONTI-DÍAZ, I. A. The frequent isolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. **Sabouraudia**, v.10, p. 266-273. 1972.

GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; AZEVEDO, C. M. P. S.; SALGADO, C. G.; SILVA, M. B.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; ANDRADE, T. S.; TAKAGI, E. H.; CRUZ, K. S.; FORNARI, G.; HAHN, R. C.; SCROFERNEKER, M. L.; CALIGNE, R. B.; RAMIREZ-CASTRILLON, M.; ARAÚJO, D. P.; HEIDRICH, D.; COLOMBO, A. L.; DE HOOG, G. S. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

GONZÁLEZ, G. M.; ROJAS, O.C.; GONZÁLEZ, J.G.; KANG, Y.; DE HOOG, G.S. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p.148–151, 2013.

HAMZEHEI, H.; YAZDANPARAST, S.A.; DAVOUDI, M.M.; KHODAVAISY, S.; GOLEHKHEYLI, M.; ANSARI, S.; DE HOOG, G.S.; BADALI, H. Use of rolling circle amplification to rapidly identify species of *Cladophialophora* potentially causing human infection. **Mycopathologia**, v. 175, p. 431-438; 2013.

HARRIS, J.E.; SUTTON, D.A.; RUBIN, A.; WICKES, B.; DE HOOG, G.S.; KOVARIK, C. *Exophiala spinifera* as a cause of cutaneous phaeohyphomycosis: case study and review of the literature. **Medical Mycology**, v. 47, p. 87–93, 2009.

HEIDRICH, D.; GONZÁLEZ, G.M.; PAGANIC, D.M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; SCROFERNEKERA, M. L. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. **Medical Mycology Case Reports**, v.16, p. 25–27, 2017

HEINRICHS, G.; DE HOOG, G. S.; HAASEA, G. Barcode identifiers as a practical tool for reliable species assignment of medically important black yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p.3023–3030, 2012.

IRINYI, L.; LACKNER, M.; DE HOOG, S.; WIELAND, M. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. **Fungal Biology**, v. 120, p. 125–136. 2016.

KEHOE, D.M.; VILLAND, P.; SOMERVILLE, S. DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. **Trends in Plant Science**, v. 4, p.38-41, 1999.

LACKNER, M.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; LU, O.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 126–133, 2012.

LIBERT, X.; CHASSEUR, C.; PACKEU, A.; BUREAU, F.; ROOSENS, N. H.; DE KEERSMAECKER, S. J. C. A molecular approach for the rapid, selective and sensitive detection of *Exophiala jeanselmei* in environmental samples: development and performance assessment of a real-time PCR assay. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1377–1392, 2016.

LIEVENS, B.; BROUWER, M.; VANACHTER, A.C.R.C; CAMMUE, B.P.A.; THOMMA, B.P.H.J. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. **Plant Science**, v.171, p.155–165, 2006.

MCGRATH, K.C.; MONDAV, R.; SINTRAJAYA, R.; SLATTERY, B.; SCHMIDT, S.; SCHENK, P.M. Development of an environmental functional gene microarray for soil microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p. 7161–7170, 2010.

MARQUES, G. F.; BARRETO, J.A.; MASUDA, P. Y.; WACHHLOZ, P.A.; SOUSA, J.M.P. Clinical and demographic profile of chromoblastomycosis in a referral service in the midwest of São Paulo state (Brazil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, p.140-2, 2015.

MARQUES, S.G.; SILVA, C.M.P.; SALDANHA, P.C.; REZENDE, M.A.; VICENTE, V.A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J.M.L.; Isolation of *Fonsecaea* from the shell of the babassu coconut (*Orbygnia phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, vol. 47, n.4; 2006.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE V.A.; XI, L.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 48, p. 800–806, 2010.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, G. S. Rapid detection and identification of fungal pathogens by rolling circle amplification (RCA) using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, v.54, p. 577-582, 2011.

NAJAFZADEH, M. J.; DOLATABADI, S.; SARADEGHI KEISARI, M.; NASERI, A.; FENG, P.; DE HOOG, G. S. Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, p. 338–342, 2013.

NILSON, M.; MALMGREN, H.; SAMIOTAKI, M.; KWIATKOWSKI, M.; CHOWDHARY, B.P.; LANDEGREN, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. **Science**, v. 265, 1994.

NIMRICHTER, L.; CERQUEIRA, M.D.; LEITÃO, E.A.; MIRANDA, K.; NAKAYASU, E.S.; ALMEIDA, S.R.; ALMEIDA, I.C.; ALVIANO, C.S.; BARRETO-BERGTER, E.; RODRIGUES, M.L. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 7860–7868, 2005.

PIRES, C.A.; QUARESMA, J.A.S.; DE MACEDO, G.M.M.; XAVIER, M.B.; DE BRITO, A.C. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the Brazilian Amazon region. **Archives of Medical Research**, v. 44, p.302-306, 2013.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.E.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R.; SALGADO, C. G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 47, p. 3-15, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis, a neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, 2015

QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, S.G.; SANTOS, D.C.; SALGADO, C.G.; VICENTE, V.A.; BONIFAZ, A.; ROILIDES, E.; XI, L.; AZEVEDO, A.M.P.; SILVA, M.B.; PANA, Z.D.; COLOMBO, A.L.; WALSH, T. J. Chromoblastomycosis: a neglected global disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, p. 233-276, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D.W.C.L. Chromoblastomycosis in the Clinical Practice. **Current Fungal Infection Reports**, v.6, p.312-9, 2012.

- RODRIGUES, A.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; DE CAMARGO, Z. P. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers Microbiology**, v.6, p.1385, 2015.
- RUBIN, H. A.; BRUCE, S.; ROSEN, T.; MCBRIDE, M. E. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, n.5, 1991.
- SALGADO, C.G.; SILVA, J.P.; DINIZ, J.A.P.; SILVA, M.B.; COSTA, P.F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U.I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p.33-36, 2004.
- SANTOS, A.L.S.; PALMEIRA, V.F.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, L.F.; NIMRICHTER, L.; ALVIANO, D.S.; RODRIGUES, M.L.; ALVIANO, C.S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p.570-591, 2007.
- SEYEDMOUSAVI, S.; GUILLOT, J.; DE HOOG, G. S. Phaeohyphomycoses, emerging opportunistic diseases in animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 19–35, 2013.
- SEYEDMOUSAVI, S.; NETEA, G.M.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.; DE HOOG, G. S. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p. 527–542, 2014.
- SHI, D.; ZHANG, W.; LU, G.; DE HOOG, G.S.; LIANG, G.; MEI, H.; ZHENG, H.; SHEN, Y.; LIU, W. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* misdiagnosed as sporotrichosis and cutaneous tuberculosis in a pulmonary tuberculosis patient. **Medical Mycology Case Reports**, v.11, p.57–60, 2016.
- SIBLEY, C.D.; PEIRANO, G.; CHURCH, D.L. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology, Infection. **Genetics and Evolution**, v. 12, p.505-521, 2012.
- SINGH, B. P.; GUPTA, V. K. **Molecular Markers in Mycology: Diagnostics and Marker**; Springer, 2017.
- SIQUEIRA, I.M.; DE CASTRO R.J.A.; LEONHARDT, L.C.M.; JERÔNIMO, M.S.; SOARES, A.C.; RAIOL, T.; NISHIBE, C.; ALMEIDA, N.; TAVARES, A.H.; HOFFMANN, C.; BOCCA, A.L. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, p. e0005461, 2017.
- SMITH, C.J.; OSBORN, A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v.67, p.6–20, 2009.
- SOMOGYVARI, F.; HORVATH, A.; SERLY, J.; MAJOROS, H.; VAGVOLGYI, C.; PETO, Z. Detection of invasive fungal pathogens by Real-time PCR and high-resolution melting analysis. **In vivo**, v. 26, p. 979-984, 2012.

SUN, J.; NAJAFZADH, M.J.; VICENTE, V.A.; XI, L.; DE HOOG, G.S. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p.19-24, 2010.

TEHRANI, S.J.; ALIABADIAN, M.; FATA, A.; NAJAFZADEH, M. J. Rolling circle amplification (RCA): an approach for quick detection and identification of fungal species. **Journal of Mycology Research**, v. 1, p. 55-62, 2014.

TEIXEIRA, M.M.; MORENO, L.F.; STIELOW, B. J.; MUSZEWSKA, A.; HAINAUT, M.; GONZAGA, L.; ABOUELLEIL, A.; PATANÉ, J.S.L.; PRIEST, M.; SOUZA, R.; YOUNG, S.; FERREIRA, K.S.; ZENG, Q.; DA CUNHA, M.M.L.; GLADKI, A. ; BARKER, B.; VICENTE, V.A.; DE SOUZA, E.M.; ALMEIDA, S.; HENRISSAT, B.; VASCONCELOS, A.T.R.; DENG, S.; VOGLMAYR, H.; MOUSSA, T.A.A.; GORBUSHINA, A.; FELIPE, M. S.S.; CUOMO, C. A.; DE HOOG, G. S. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1–28, 2017.

TORRES-GUERRERO, E.; ISA-ISA, R.; ISA, M.; ARENAS, R. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v.30, p.403-408, 2012.

TSUI, C.K.M.; WOODHALL, J.; CHEN, W.; LEVESQUE, C.A.; LAU, A.; SCHOENS, C.D.; BACHIENS, C.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. **IMA Fungus**, v. 2, p.177-189, 2011.

VAN ELSAS, J.D.; BOERSMA F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 77-87, 2011.

VICENTE, V.A.; ATTILI-AGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.

VICENTE, V. A.; RIBEIRO, O.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; GUERRA, R.S.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.; DE HOOG, G.S.; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with lethargic crab disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v. 158, p.109–122, 2012.

VICENTE, V.A.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; ROMES, R.R.; ROBL, D.; MARQUES, S.G.; AZEVEDO, C.M.P.S.; DE HOOG, G.S., Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2014.

VICENTE, V.A.; WEISS, V.A.; BOMBASSARO, A.; MORENO, L. F.; COSTA, F. F.; RAITTZ, R.T.; LEÃO, A.C.; GOMES, R.R.; BOCCA, A.L.; FORNARI, G.; DE CASTRO, R.J.A.; SUN, J.; FAORO, H.; TADRA-SFEIR, M.Z.; BAURA, V.; BALSANELLI, E.; ALMEIDA, S.R.; DOS SANTOS, S.S.; TEIXEIRA, M.D.M.; SOARES, F.M.S.; DO NASCIMENTO, M.M.F.; PEDROSA, F.O.; STEFFENS, M.B.; ATTILI-ANGELIS, D.; NAJAFZADEH, M.J.; QUEIROZ-TELLES, F.; SOUZA, E.M.; DE HOOG, G. S. Comparative genomics of sibling species of *Fonsecaea* associated with human chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.1924, 2017.

WALKER, D.H.; MCGINNIS, M.R. Diseases caused by fungi. **Pathobiology of Human Disease**, 2014.

WANG, B.; POTTER, S.J.; LIN, Y.; CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E.; SU, Y.; MA, X.; HOU, Y.; SAKSENA, N.K. Rapid and Sensitive Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Rolling Circle Amplification. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.43, n. 5, p. 2339–2344, 2005.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A; GELFAND, D. H., SNINSKY, J.J.; WHITE T. J. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, p. 315-322. Academic Press: San Diego, U.S.A., 1990.

WILCZYNSKI, S.P. Molecular Biology, In: WEIDNER, N.; COTE, R. J.; SUSTER, S.; WEISS, L.M. **Modern Surgical Pathology**, 2 ed., Elsevier, 2009.

YANG, Y.P.; LI, W.; HUANG, W.M.; ZHOU, Y.; FAN, Y. M. Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea*: clinicopathology, susceptibility and molecular identification of seven consecutive cases in southern China. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, p., 1023-1028, 2013.

YANG, X.; HAMEED, U.; ZHANG, A.F.; ZANG, H.,Y.; GU, C.Y.; CHEN, Y.; XU, Y.L. Development of a nested-PCR assay for the rapid detection of *Pilidiella granati* in pomegranate fruit. **Scientific Reports**, v.7, p. 40954 1-8, 2017.

ZOU, B.; MA, Y.; WUB, H.; ZHOU, G. Signal amplification by rolling circle amplification on universal flaps yielded from target-specific invasive reaction. **Analyst**, v. 137, p.729–734, 2012.

CAPÍTULO II - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Fonsecaea pedrosoi* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS POR SONDA CADEADO BASEADO EM AMPLIFICAÇÃO EM CÍRCULO ROLANTE (RCA)

Caracterização molecular de *Fonsecaea pedrosoi* em amostras ambientais por Sonda Cadeado baseado em Amplificação em Círculo Rolante (RCA)

Morgana F. Voidaleski^{1, 2}; Renata Rodrigues Gomes¹; Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo³; Amanda Bombassaro^{1, 2}; Flávia de Fátima Costa^{4, 2}; Bruna Jacomel Favoretto de Souza Lima^{1, 2}; Gheniffer Fornari¹; Mohammad J. Najafzadeh⁵; Jiufeng Sun⁶; Sybren De Hoog^{1, 7, 8}; Vania Aparecida Vicente^{1, 4}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia; Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica; Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

² CAPES, Ministério da Educação do Brasil, Brasília – DF, Código Postal: 70.040-020;

³ Departamento de Medicina, Universidade Federal do Paraná, Vila Bacanga, Maranhão, Brasil.

⁴ Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brasil.

⁵ Departamento de Parasitologia e Micologia, Escola de Medicina, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

⁶ Departamento de dermatologia, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, China

⁷ CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, Holanda

⁸ Instituto de Biodiversidade e Ecossistemas dinâmicos, University of Amsterdam, Amsterdam, Holanda

1 RESUMO

O fungo *Fonsecaea pedrosoi* compreende o principal agente etiológico da cromoblastomicose humana, uma micose de implantação, crônica cutânea ou subcutânea, caracterizada pela presença de corpos muriformes no tecido do hospedeiro. A hipótese atual é que os pacientes adquirem a infecção através da lesão com fragmentos de materiais vegetais, principalmente através de trumas com espinhos de plantas. Entretanto, estudos de isolamento tem demonstrado uma baixa frequência de recuperação de espécies agentes causais da doença, destes substratos. Sendo assim, no presente estudo foi avaliado a detecção de *F. pedrosoi* em amostras de solo, material em decomposição, folha, caule e espinhos de plantas procedentes de áreas endêmica para cromoblastomicose no estado do Maranhão, norte do Brasil. As amostras foram analisadas usando o método de detecção molecular através de sonda cadeado baseada em Amplificação em Círculo Rolante (RCA) seguido do protocolo de isolamento de flotação em óleo mineral. O DNA genômico total de amostras de material vegetal em decomposição, solo e das plantas *Solanum paniculatum*; *Astrocaryum vulgare*; *Platonia insignis*; *Scoparia dulcis*; *Murraya paniculata*; *Urtica* spp. foram analisados por RCA identificando a ocorrência de *F. pedrosoi* em amostras de solo (n=1), material em decomposição (n=2) e da folha da planta *Solanum paniculatum* (jurubeba) (n=1). O limite de detecção do método foi avaliado em $2,88 \times 10^7$ cópias do DNA de interesse por amostra. Os isolados recuperados pelo isolamento seletivo apresentaram morfologia semelhante aos gêneros *Fonsecaea* e *Cyphellophora*, porém análises moleculares demonstraram que as linhagens diferiam das espécies relatadas como agentes etiológicos da cromoblastomicose. Os dados obtidos neste estudo mostraram que a sonda/RCA é uma ferramenta adicional que contribui em estudos de detecção ambiental, por sua especificidade e sensibilidade na detecção do DNA de *F. pedrosoi* em planta. Entretanto, os estudos de isolamento demonstraram limitação na recuperação dos agentes de cromoblastomicose das amostras positivas pelo método molecular.

Palavras-Chave: Leveduras negras. Sonda cadeado. Amplificação em Círculo Rolante. Detecção ambiental. *F. pedrosoi*. Cromoblastomicose.

2 ABSTRACT

The fungus, *Fonsecaea pedrosoi* is the major etiological agent of human chromoblastomycosis, a chronic cutaneous or subcutaneous mycosis characterized by the presence of muriform cells in the host tissue. The current hypothesis of infection is the fungus implantation by fragments of plant materials, especially by plant thorns. However, isolation studies have demonstrated a low frequency of pathogenic agents in environmental substrates. Thus, the present study aim to detect *F. pedrosoi* in soil, decomposing plant material, leaf, stem and plant spines samples, from chromoblastomycosis endemic areas in Maranhão, northern Brazil. The plants collected was identified as *Solanum paniculatum*; *Astrocaryum vulgare*; *Platonia insignis*; *Scoparia dulcis*; *Murraya paniculata*; *Urtica* spp. The total genomic DNA of environmental samples were analyzed using padlock probe based on Rolling Circle Amplification (RCA) followed by isolation protocol of flotation in mineral oil.

Fonsecaea pedrosoi was positive in soil samples (n = 1), decomposing plant material (n = 2) and leaf of the *Solanum paniculatum* (jurubeba) (n = 1). The limit of detection of the method was 2.88×10^7 copies of the DNA per sample. The isolates recovered by selective isolation showed macro and micromorphology similar to the genera *Fonsecaea* and *Cyphellophora*, but molecular analyzes demonstrated that this are not agents of chromoblastomycosis. The data obtained in this study showed that the padlock probe alyed with RCA is an additional tool to environmental detection studies, due to its specificity and sensitivity for detection of *F. pedrosoi* DNA in plants. However, the isolation studies showed a limitation in the isolation of the chromoblastomycosis agents, including the positive samples by the molecular method.

Key Words: Black yeast. Padlock probe. Rolling Circle Amplification. Environmental screening. *F. pedrosoi*. Chromoblastomycosis.

3 INTRODUÇÃO

A família Herpotrichiellaceae compreende organismos envolvidos em infecções que acometem animais e humanos pertencentes à ordem Chaetothyriales (DENG et al, 2015). Esses fungos exibem uma variação ecológica complexa, podendo estar presentes em condições adversas e extremas, como rochas, clima árido e quente, nichos tóxicos e como patógenos oportunistas (NASCIMENTO et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017).

Os fatores de virulência são compartilhados por todos os membros da família, sendo eles a presença de melanina e caroteno, paredes espessas de células, diferenciação em células muriformes, fases leveduriforme, osmotolerância, adesão, hidrofobicidade, assimilação de hidrocarbonetos aromáticos e produção de sideróforos, sendo que estes contribuem para a natureza oportunista dos agentes infecciosos (VICENTE et al., 2012; SEYEDMOUSAVI et al., 2014).

Cromoblastomicose é uma infecção subcutânea rara e crônica em pacientes imunocompetentes de característica nodular e formação de células muriformes resultantes da resposta imune granulomatosa (WALKER; MCGINNIS; 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2017). As espécies clinicamente relevantes estão em gêneros como *Exophiala*, *Cyphellophora*, *Phialophora* e *Rhinocladiella* e principalmente *Cladophialophora* e *Fonsecaea*, com diferentes padrões de distribuição influenciada pelas características ambientais da área de ocorrência da doença (NAJAFZADEH et al., 2011; SEYEDMOUSAVI et al., 2014; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). *Fonsecaea pedrosoi* é maior agente etiológico da doença no estado do Maranhão, Brasil (GOMES et al., 2016). A cromoblastomicose é

considerada uma doença tropical negligenciada, de característica ocupacional ligada a trabalhadores agrícolas (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

Dados epidemiológicos da doença demonstram a origem ambiental desta, sendo a infecção frequentemente relatada após a ocorrência de um trauma cutâneo principalmente com espinhos de plantas e/ou lascas de madeira relacionando as espécies patogênicas de leveduras negras a plantas vivas (SALGADO et al., 2004). O conhecimento sobre a ocorrência ambiental de agentes infecciosos é vital no entendimento das vias de infecção, porém a dificuldade reside no grande esforço amostral requerido (SUDHADHAM et al., 2010). Estudos de isolamento tem demonstrado que as espécies clínicas são frequentemente recuperadas de substratos vegetais em decomposição, enquanto que os isolados de plantas vivas são espécies diferentes proximamente relacionadas aos agentes de cromoblastomicose (VICENTE et al., 2008; VICENTE et al., 2014). Entretanto, análises de genômica comparativa das espécies de *Fonsecaea* demonstram que espécies ambientais e patogênicas compartilham domínios gênicos associados a invasão do tecido vegetal, suportando a hipótese da inoculação traumática (VICENTE et al., 2017).

Marcadores moleculares são ferramentas úteis, na caracterização do habitat natural das espécies clínicas, apresentam-se com alta especificidade, reprodutibilidade e sensibilidade (SUN et al., 2010). Porém, através do isolamento do DNA total de amostras ambientais permitem a avaliação geral da diversidade, contribuindo para a taxonomia, classificação, inferência filogenética destes agentes (VAN ELSAS; BOERSMA 2011; TEHRANI, 2014; IRINYI et al., 2015).

Para elucidação desses aspectos epidemiológicos são necessários métodos eficazes na recuperação e caracterização dos agentes patogênicos (SUN et al., 2010; TSUI et al., 2011; QUEIROZ-TELLES et al., 2017). Sondas cadeado, por exemplo, são oligonucleotídeos com cerca de 100 bp que reconhecem sequências adjacentes no DNA alvo com aplicação na genotipagem de mutações pontuais únicas (SNPs) em grandes populações (por exemplo > 500 indivíduos) (NILSSON et al., 1994; ATKINS; CLARK, 2004; TSUI et al., 2011). Os produtos de ligação da sonda cadeado podem ser amplificados pelo método isotérmico de amplificação em círculo rolante (RCA), um método molecular sensível e específico na detecção de *F. pedrosoi* (NAJAFZADEH et al., 2011).

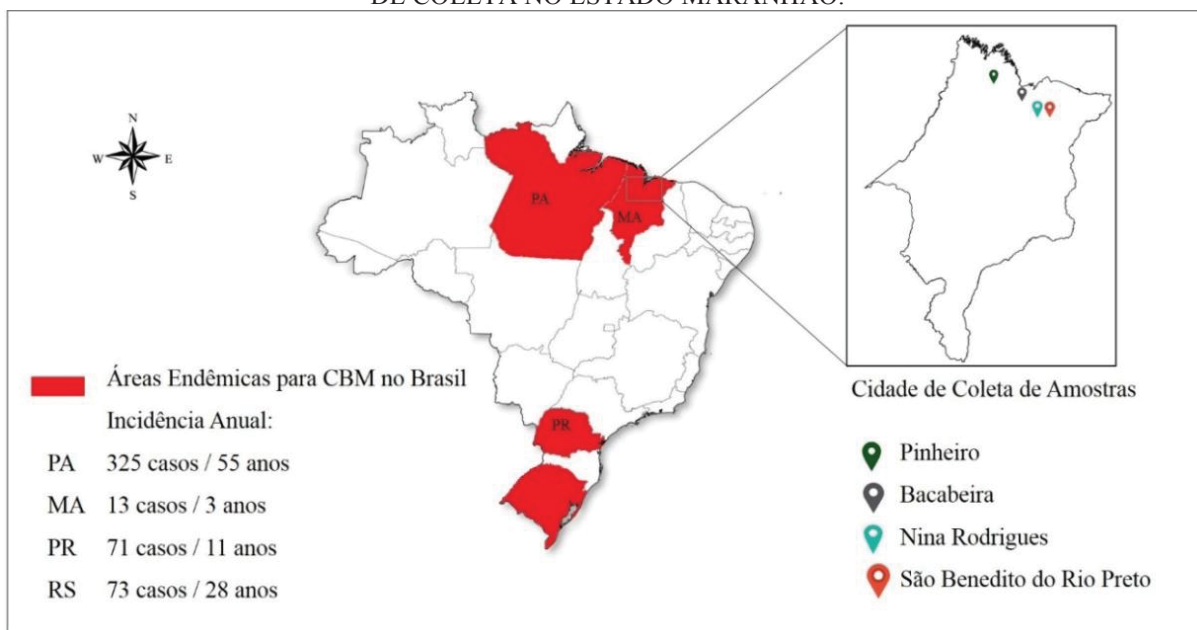
Assim, o objetivo deste trabalho foi a detecção ambiental de *F. pedrosoi* em material em decomposição, plantas e solo de regiões endêmicas no estado do Maranhão, Brasil, por isolamento seletivo e detecção molecular com o método de RCA. Os dados contribuem para elucidar as vias de infecção e o nicho ecológico ocupado pelos agentes de cromoblastomicose.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREAS DE ESTUDO, AMOSTRAGEM E LINHAGENS ESTUDADAS.

Amostras ambientais de solo, material em decomposição e plantas foram coletadas na área de vida de pacientes sintomáticos. O estudo abrangeu 04 cidades da região norte do estado do Maranhão e 87 amostras ambientais (FIGURA 1). Plantas como *Solanum paniculatum*; *Astrocaryum vulgare*; *Platonia insignis*; *Scoparia dulcis*; *Murraya paniculata*; *Urtica* spp. foram fragmentadas em folha, caule e espinho, quando presentes. Individualmente, em embalagens de papel esterelizadas, foram separados 30g de cada substrato (MARQUES et al., 2006; GOMES et al., 2016). Neste estudo foram avaliadas linhagens de leveduras negras de procedência ambiental utilizando como referencia espécies dos diferentes gêneros da família *Herpotrichiellaceae* e da família *Cyphellophoraceae*, sumarizadas na Tabela 1.

FIGURA 1- REGIÕES ENDÊMICAS PARA CROMOBLASTOMICOSE (CBM) NO BRASIL E CIDADES DE COLETA NO ESTADO MARANHÃO.



A incidência anual da doença e as áreas endêmicas estão de acordo com Queiroz-Telles e colaboradores (2017). As cidades são da região Norte do estado do Maranhão. Bacabeira (Cinza) (Latitude: 02° 58' 15" S; Longitude: 44° 18' 56" W; Altitude: 44m; Área: 650 Km²). São Benedito do Rio Preto (vermelho) (Latitude: 3° 19' 59" S; Longitude: 43° 31' 40" W; Altitude: 22 m; Área: 931,48 km²). Pinheiro (verde) (Latitude: 02° 31' 17" S; Longitude: 45° 04' 57" W; Altitude: 15m; Área: 1559 Km²). Nina Rodrigues (azul) (Latitude: 3° 27' 53" S; Longitude: 43° 54' 19" W; Altitude: 33m; Área: 572,5 km²).

4.2 ISOLAMENTO

Aproximadamente 20g de cada amostra coletada foram processadas utilizando metodologia descrita por Iwatsu et al. (1981) adaptada por Vicente et al. (2008), incubadas à temperatura ambiente durante 30 min. em 100 mL de solução salina esterilizada contendo 200 U de penicilina, 200 ug/L de estreptomicina, 200 ug/L de cloranfenicol e 500 ug/L de cicloheximida. Após a incubação adicionou-se 20 mL de óleo mineral esterilizado à solução, seguido por vigorosa agitação por 5 min. seguidos de 20 min. de repouso. A interface óleo-água foi coletada e plaquada em ágar Mycosel (Difco) e posteriormente incubadas por 4 semanas a 28 °C. Um total de 87 amostras (20 de solo; 20 de material em decomposição; 20 de folha; 20 de caule; 07 de espinhos) foram obtidas entre as quatro regiões estudadas, adotando cinco repetições por amostra totalizando 435 réplicas.

4.3 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

A identificação preliminar foi realizada com base em características macro e microscópicas das colônias após a cultura em ágar de dextrose de Sabouraud incubadas a 28°C (DE HOOG et al., 2014). As colônias negras foram selecionadas e transferidas para Agar Mycosel e depositadas nas Coleções Microbiológicas da Rede Paranaense- CMRP (<http://www.splink.org.br>) para posterior avaliação molecular.

4.3.1 Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizado o protocolo descrito por Vicente et al., (2008) no qual a amostra fúngica foi macerada em microtubo contendo sílica: celite (2:1) e 200 µL de CTAB (brometo decetil-trimetilamônio) e 500 µL de CIA (solução ácida de clorofórmio álcool isoamílico) com centrifugação por 7 min. a 16000g. O DNA foi precipitado com álcool 96% gelado seguido de duas lavagens com 500 µL de etanol 70%, desidratado e novamente hidratado com água ultrapura. O DNA foi quantificado por espectrofotômetro NanoDrop® e a verificação da integridade foi realizada através da eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

4.3.2 Sequenciamento e análise filogenética

A suspensão de DNA foi amplificada e sequenciada a região ITS1-5.8S rDNA-ITS2, usando os oligonucleotídeos iniciadores universais ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (WHITE et al., 1990; O'DONNELL, 1993) de acordo com protocolo descrito por Vicente et al. (2008). O sequenciamento foi realizado em sequenciador ABI3730 (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram alinhadas utilizando software Mega 7 e comparadas com o banco de dados Isham Barcoding Database (<http://its.mycologylab.org/>) e Blast do GenBank (NCBI). Um total de 51 linhagens de referencia foram incluídas em estudo filogenético a fim de estabelecer as relações filogenéticas por análise de Máxima Verossimilhança em software Mega 7 (Tabela 1).

4.3 SONDA CADEADO BASEADO EM RCA NA DETECÇÃO DE *F. pedrosoi*, EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

4.3.1 Extração do DNA total de amostras ambientais

Para extração de DNA total de plantas e material em decomposição foi adaptada metodologia com base nos protocolos descritos por Vicente et al., (2008) e Ferreira e Grattapaglia (1995). Aproximadamente 250 mg da amostra ambiental, foram transferidos para um microtubo de 2 mL contendo uma mistura de sílica: celite (2:1) e 700 µL de CTAB, seguido de maceração manual por 5 minutos, adicionando-se à mistura um volume de 1,4 µL de β-mercaptoetanol, seguido de agitação por 30 segundos e incubação a 65 °C por 1 hora. Em seguida, adicionou-se 600 µL de CIA (solução ácida de clorofórmio álcool isoamílico, 24:1) e após a centrifugação a 12000 g por 10 min., o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 800 µL de isopropanol 100% gelado. Os microtubos permaneceram a -20°C por 45 min. e posteriormente centrifugados a 12000 g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado. Na sequência foram realizadas duas lavagens com 500 µL de etanol 70% e uma com 500 µL de etanol absoluto, ambas seguidas de centrifugação a 12000 g por 5 min. O precipitado de DNA formado foi seco em cabine de fluxo laminar e reidratado com 100 µL de água ultrapura, por 12 h. A integridade e a pureza do DNA foram avaliadas por espectrofotometria NanoDrop™ (Thermo Scientific™) e eletroforese em gel de agarose 1%.

A extração do DNA total das amostras de solo foi realizada segundo protocolo descrito comercialmente, utilizando E.Z.N.A.® Soil DNA (Omega Bio-Tek).

TABELA 1- LINHAGENS DE REFERENCIA DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA HERPOTRICHIELLACEAE E CYPHELLOPHORACEAE (continua)

Nome	CBS	Outras Referências	Substrato/Localização	Genbank ITS
<i>Cladophialophora arxii</i>	306.94 (T)	-	Abscesso traqueal, Homem/Alemanha	EU103986
<i>Cladophialophora boppii</i>	126.86 (T)	FMC 292	Lesão de pele, Homem/Brasil	EU103997
<i>Cladophialophora carrionii</i>	260.83 (T)	CDC B-1352, FMC 282	Lesão de Pele, Homem/Desconhecido	EU137292
<i>Cladophialophora devriesii</i>	147.84 (T)	dH15404	Homem/USA, Ilha Grande Cayman	EU140595
<i>Cladophialophora emmonsii</i>	102594	dH11918	Úlcera da Mão /EUA, Virgínia	KF155214
<i>Cladophialophora immunda</i>	834.96 (T)	dH21287	Micose Subcutânea, Homem /EUA, Geórgia, Atlanta	EU137318
<i>Cladophialophora modesta</i>	985.96	NCMH 108, UAMH 4004	Cérebro, Homem/EUA	GU225939
<i>Cladophialophora yegresii</i>	114405	UNEFM SgSr3	<i>Stenocereus griseus</i> , cactos/Venezuela	EU137322
<i>Cyphellophora laciniata</i>	190.61	ATCC 14166; MUCL 9569	Pele, Homem/ Basel, Switzerland	EU035416
<i>Cyphellophora laciniata</i>	239.91	-	Pele, Homem/ Holanda	JQ766424
<i>Cyphellophora vermispora</i>	228.86	-	<i>Triticum aestivum</i> , raiz/ Monheim	JQ766426
<i>Cyphellophora suttonii</i>	449.91	CDC B-2963; IMI 233463	Lesão Subcutânea, Cachorro/ Estados Unidos	JQ766464
<i>Cyphellophora fusarioides</i>	130291	MUCL 44033; IHFM 6073;	Humano/Israel	JQ766439
<i>Cyphellophora pauciseptata</i>	284.85	-	Pele, Homem/Desconhecido	NR_132868
<i>Cyphellophora reptans</i>	113.85	-	Desconhecido/Sweden	NR_121346
<i>Cyphellophora reptans</i>	152.90	-	Unha do Pé/Norte da Holanda	JQ766446
<i>Cyphellophora guayanensis</i>	124764	CPC 13412; CPC 13413	<i>Eucalyptus</i> /Queensland, Austrália	GQ303274
<i>Cyphellophora ambigua</i>	235.93	-	Unha, humano/ Delft, Holanda	JQ766431
<i>Cyphellophora olivacea</i>	122.74	-	Papel de parede úmido/ Kiel-Kitzeberg, Alemanha	KC455247
<i>Cyphellophora musae</i>	-	GLZXJ41	Fruto <i>Musa basjoo</i> / China	KP010370
<i>Cyphellophora pluriseptata</i>	268.85	-	Folha caída <i>Zostera marina</i> / Holanda	FJ217679.
<i>Cyphellophora phyllostachydis</i>	-	HLHNZWYZZ08	Galho de <i>Phyllostachys heterocycla</i> /China	KP010371.
<i>Cyphellophora europaea</i>	101466	dH11284	Pé, Humano/ Dordrecht, Holanda	EU514698
<i>Cyphellophora europaea</i>	218.78	-	Unha do Pé, Humano/ Holanda	JQ766441
<i>Cyphellophora oxyspora</i>	698.73	UAMH 4935	<i>Clerodendron monahassa</i> , folha/ Sri Lanka	NR_132883
<i>Cyphellophora oxyspora</i>	124686	-	Folha de <i>Clerodendron monahassa</i> / Sri Lanka	JQ766451
<i>Cyphellophora ludoviensis</i>	-	CMRP1317	Lesão de pele, Humano/ Maranhão, Brasil	KX434722
<i>Cyphellophora capiguarae</i>	132767	dH 22956	Formiga/ São Paulo, Rio Claro, Brasil	KF928464
<i>Cyphellophora sessilis</i>	238.93	-	Filtro biológico para fumos contendo estireno/Holanda	KF928459
<i>Cyphellophora sessilis</i>	243.85	LM 328	Resina, <i>Picea abies</i>	EU514700
<i>Exophiala angulospora</i>	482.92 (T)	-	Água Potável/Japão	EF413618

TABELA 1- LINHAGENS DE REFERENCIA DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA HERPOTRICHIELLACEAE E CYPHELLOPHORACEAE (conclusão)

Nome	CBS	Outras Referências	Substrato/Localização	Genbank ITS
<i>Exophiala equina</i>	116009	dH 13221, F1090	Tartaruga de Galápagos/EUA, Chicago	JF747095
<i>Exophiala jeanselmei</i>	507.90(T)	dH 15933, ATCC 34123	Homem/Uruguai	AY156963
<i>Exophiala pisciphila</i>	537.73	AFTOL 669, ATCC 24901	Peixe <i>Ictalurus punctatus</i> /Alabama	AF050272
<i>Exophiala salmonis</i>	157.67(T)	BMU 00834	Truta, cérebro/Canadá	JF747137
<i>Exophiala spinifera</i>	101534	IFM 41698	Solo/China	MF039706
<i>Exophiala xenobiotica</i>	117642	dH 13376	Ferida no pé/EUA	DQ182593
<i>Fonsecaea brasiliensis</i>	119710 (T)	dH 16818	Carangueijo/Brazil, Sergipe, Brejo Grande, Manguezal	JN173784
<i>Fonsecaea erecta</i>	125763 (T)	-	Espinho Japacanga (Smilacaceae) /Bacabeira	KC886414
<i>Fonsecaea minima</i>	125760 (T)	-	Folha de palmeira (<i>Orbignya speciosa</i>) / Icatu	KC886416
<i>Fonsecaea monophora</i>	269.37 (T)	dH 12659	Cromblastomicose/América do Sul	AY366906
<i>Fonsecaea multimorphosa</i>	980.96 (T)	NCMH 1412	Feohifomicose, gato / Queenslândia, Austrália	JF267657
<i>Fonsecaea nubica</i>	269.64(T)	dH 15656	Cromblastomicose/Camarões	EU938592
<i>Fonsecaea pedrosoi</i>	271.37 (T)	dH15659	Cromblastomicose/América do Sul	AY366914
<i>Knufia epidermides</i>	120353	dH 16733	Infecção no pé, Homem/China	NR_111330
<i>Neophaeoocomyces catenatus</i> ,	650.76 (T)	ATCC 42183	Ar/Lausanne, Switzerland	AF050277
<i>Phialophora americana</i> ,	273.37 (T)	ATCC 10223	Cromblastomicose/Brasil	AF050281
<i>Phialophora europaea</i>	120392	dH 16697	Pele Humana/Dinamarca	JQ766444
<i>Phialophora oxyspora</i>	416.89	dH 17023	Pele Humana/Dinamarca	JQ766449
<i>Phialophora reptans</i>	120903	dH 12534	Água Potável/Alemanha	JQ766448
<i>Phialophora verrucosa</i>	286.47	ATCC 9541	Desconhecido/Desconhecido	AF050282
<i>Phialophora verrucosa</i>	140325	BMU 07506	Feohifomicose/ Anhui, China	NR_146242

CBS-Westerdijk Fungal Biodiversity Institute; (T). Linhagem tip

4.3.2 Reação de ligação da sonda cadeado e RCA

A sonda cadeado utilizada na detecção de *F. pedrosoi*, foi desenhada e validada Najafzadeh et al. (2011), como um oligonucleotídeo espécie-específico, sem reconhecimento cruzado com outras espécies próximas. A região ITS do DNA total foi amplificada por PCR, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4, conforme condições descritas por Vicente et al. (2008). Um microlitro do fragmento amplificado foi misturado com 2 U de Pfu DNA ligase (Agilent Technologies) e 0.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ da sonda cadeado em 20 mmol l^{-1} de Tris-HCl (pH 7.5), 20 mmol l^{-1} KCl, 10 mmol l^{-1} MgCl_2 , 0.1% Igepal, 0.01 mmol l^{-1} rATP, 1 mmol l^{-1} DTT, com volume de reação total de 10 μL . A ligação da sonda foi conduzida com um ciclo de desnaturação de 5 minutos a 94 °C, seguido de 5 ciclos de 94 °C por 30 segundos e 4 min de ligação a 50°C. Um volume de 2 μL do produto de ligação foi usado como molde à reação de RCA, composta de 2 U de Bst DNA polimerase (New England Biolabs) 400 mmol l^{-1} mix desoxinucleotídeo trifosfato, 10 pmoL do iniciador RCA1 (5'-ATGGGCACCGAAGAAGCA-3') e 10 pmoL do iniciador RCA2 (5'-CGCGCAGACACGATA-3') em água destilada, com volume total de 12 μL . A amplificação do sinal do produto ligado ocorreu por incubação a 65°C por 60 minutos (Figura 2). O produto da reação foi visualizado em gel de agarose 2%. Reações positivas foram caracterizadas pela apresentação de padrão de escada, enquanto reações negativas apresentam fundo limpo.

4.3.3 Limite de detecção e especificidade

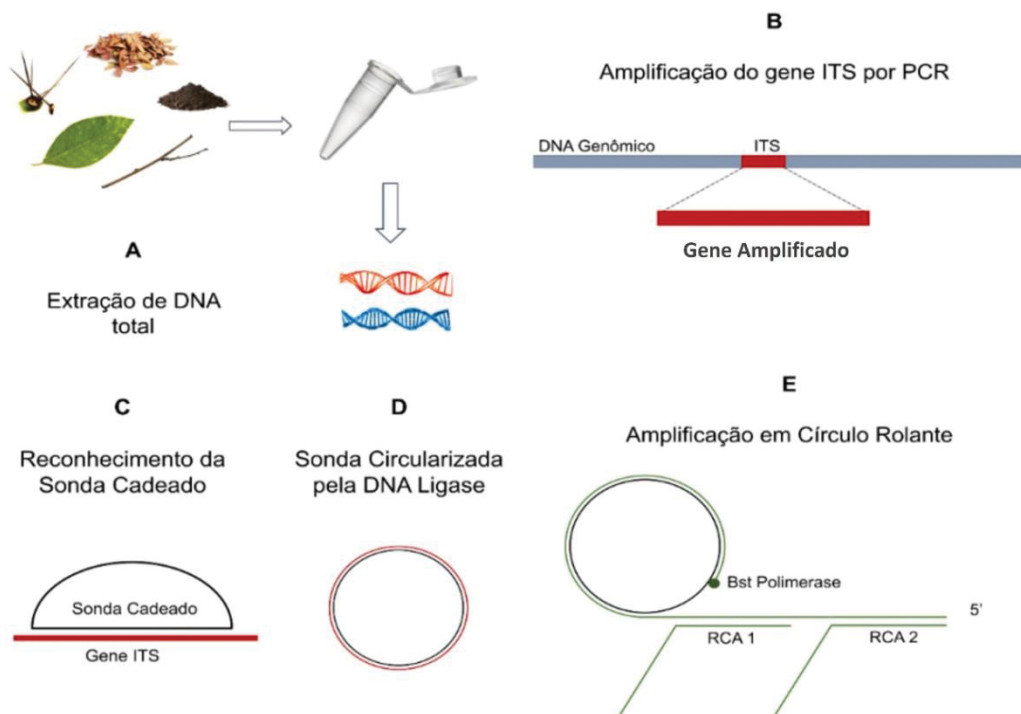
Para avaliação do limite de detecção do método de RCA, fragmentos amplificados da região ITS da espécie tipo de *F. pedrosoi* (CBS 271.37) foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop e posteriormente, diluído a uma concentração final de 2 ng/ μL . O número de cópias foi calculado com base no número da Avogadro (<http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html>). Para o cálculo, foi assumido um comprimento dos amplicons de 644 pb. Foram realizadas diluições em série de nove vezes, iniciando com $2,88 \times 10^9$ cópias e finalizando com 28,8 cópias.

Inicialmente a especificidade da sonda cadeado desenvolvida para detecção de *F. pedrosoi* foi testado *in silico*, *in vitro* e *in vivo*, aliado a RCA. *In silico*, um banco de 200 sequencias da região ITS de fungos de ocorrência ambiental foram avaliadas quanto ao

reconhecimento da sequência de nucleotídeos da sonda desenvolvida previamente desenvolvida para *F. pedrosoi* por Najafzadeh et al. (2011).

In vitro, DNAs de sete espécies fúngicas *F. monophora* (CBS 269.37), *F. nubica* (CBS 125.198), *F. erecta* (CBS 125763), *F. pugnacius* (CBM 49), *Candida albicans* (CMRP816), *Penicillium citrinum* (CMRP1538) e *Aspergillus nidulans* (CMRP2338), foram extraídos e amplificados conforme descrito acima. Fragmentos amplificados por PCR foram submetidos à sonda cadeado e RCA. A fim de simular a detecção específica de *F. pedrosoi* em material vegetal e solo, contaminamos artificialmente, 20 ng/μL dos DNAs de solo e de planta (*Mimosa pudica*, cultivada *in vitro*) com 0,5ng/μL de DNA de *F. pedrosoi* (CBS 271.37), controle positivo e 0,5ng/μL de DNA de *F. monophora* (269.37) e *F. erecta* (125760), controles negativos. *In vivo*, duas soluções de teste a uma concentração de 10⁵ células dos controles positivo e negativos citados acima, foram inoculadas através de injeção direta no caule de *Bactris gasipaes* (palmeira pupunha) cultivada em vaso e após 60 dias, frações do caule da planta foram coletadas para extração de DNA total e análise por sonda cadeado e RCA.

FIGURA 2- ESQUEMA DE ANÁLISE POR RCA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS



(A) Extração do DNA total de aproximadamente 1g dos substratos de estudo: solo, material em decomposição, folha, espinho e caule. (B) Amplificação da região ITS do DNA total extraído das amostras ambientais. (C e D) Reação de Ligação, que consiste no reconhecimento da sonda cadeado ao DNA molde no fragmento amplificado da região ITS do DNA total da amostra e circularização das sondas justapostas em ambas as extremidades pela DNA ligase. (E) Amplificação Isotérmica por RCA, com dois iniciadores, RCA 1 e RCA2, para amplificação do sinal de reconhecimento da sonda cadeado.

4.3.5 Re-isolamento das amostras positivas

As amostras positivas para RCA, foram submetidas a re-isolamento seletivo por flotação em óleo mineral, conforme descrito por Iwatsu et al. (1981) adaptada por Vicente et al. (2008). As colônias foram analisadas por microscopia óptica.

5 RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS ISOLADOS

O método de isolamento por flotação em óleo mineral selecionou 175 isolados de leveduras negras a partir das 87 amostras e 435 réplicas analisadas. Oito isolados identificados com base em características micro e macro morfológicas como *Cyphellophora*-like (n=3) e *Fonsecaea*-like (n=5) foram analisados por estudos filogenéticos com base na sequência ITS. As linhagens isoladas com morfologia similar ao gênero *Fonsecaea*, pertencia a um clado contendo espécies agentes de cromoblastomicose (Tabela 2). A linhagem CMRP3063 ficou agrupada com *F. multimorphosa* e enquanto que a linhagem CMRP2988 com *F. brasiliensis*. Outras três espécies foram agrupadas em um clado separado muito próximo a *F. brasiliensis* (Figura 3).

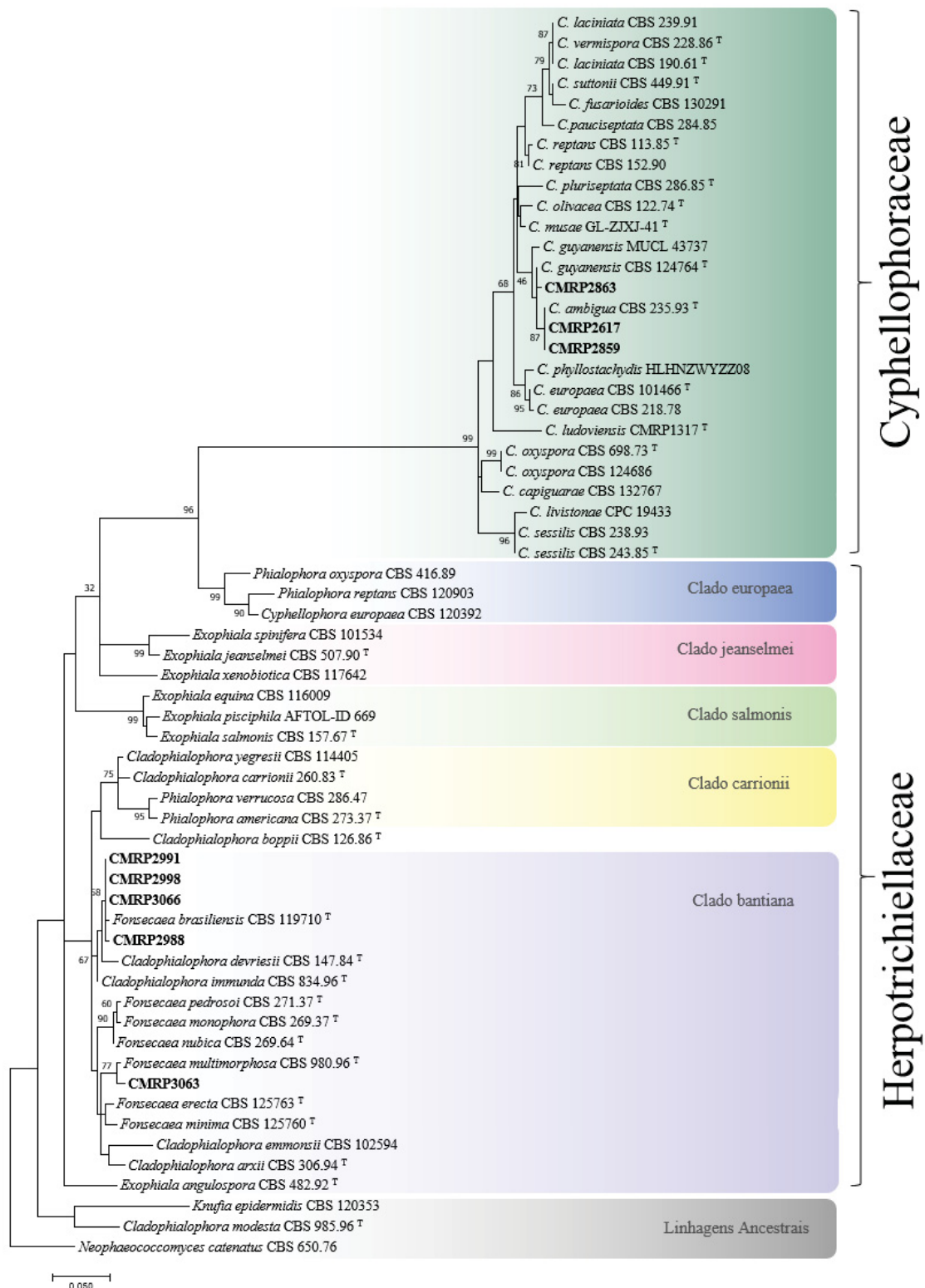
As linhagens identificadas morfológicamente como *Cyphellophora*-like, são pertencentes a família Cyphellophoraceae. A linhagem CMRP 2863 foi agrupada com a espécie *C. guayanensis* enquanto que as linhagens CMRP2617 e CMRP 2859 foram agrupadas com a espécie *C. ambigua* (Figura 3).

TABELA 2- IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA E MOLECULAR DAS LINHAGENS SELECIONADAS

Identificação Morfológica	Identificação Molecular (ITS)	CMRP	Outra Referencia	Substrato/Localidade
<i>Cypelophophora</i> spp	<i>C. ambigua</i>	2617	MA54; LMICRO1958	MD/ Bacabeira
<i>Cypelophophora</i> spp	<i>C. ambigua</i>	2859	MA106; LMICRO2041	MD/ Bacabeira
<i>Cypelophophora</i> spp	<i>C. guayanensis</i>	2863	MA110; LMICRO2045	MD/ Bacabeira
<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>F. brasiliensis</i>	2988	MA137; LMICRO2156	MD/ Nina Rodrigues
<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>Fonsecaea</i> spp.	2991	MA140; LMICRO2159	MD/ Nina Rodrigues
<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>Fonsecaea</i> spp.	2998	MA147; LMICRO2166	MD/ Nina Rodrigues
<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>F. multimorphosa</i>	3063	MA154; LMICRO2231	MD/ Nina Rodrigues
<i>Fonsecaea</i> spp.	<i>Fonsecaea</i> spp.	3066	MA158; LMICRO2234	MD/ Nina Rodrigues

CMRP- Coleções microbiológicas da Rede Paranaense; MD-Material em Decomposição.

FIGURA 3- ÁRVORE FILOGENÉTICA CYPHELLOPHORACEAE E HERPOTRICHIELLACEAE

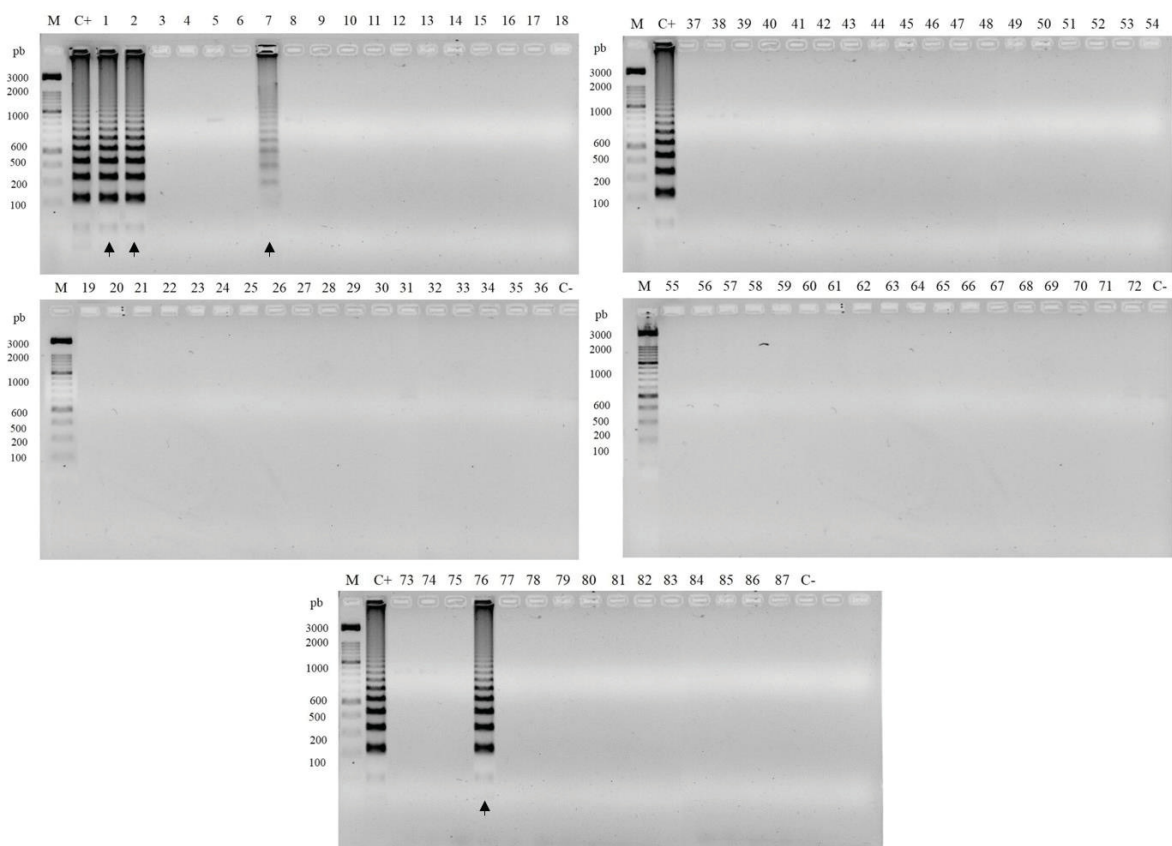


Árvore filogenética construída por parâmetros de Máxima verossimilhança com base em alinhamento na região gênica do espaçador interno transcrito (ITS), no software MEGA 7.0. O suporte de bootstrap foi calculado a partir de 1000 repetições. *Neophaeococcomyces catenatus* (CBS 650.76) foi usado como outgroup. Os isolados CMRP estão em destaque (negrito). A linhagem CMRP3063 está filogeneticamente próximos a *F. brasiliensis*, todas pertencentes ao clado bantiana. O isolado CMRP2589 foi identificado como *Cyphellophora eucalypti*, e os isolados CMRP2617 e CMRP2859, identificadas como *C. ambigua* (T) = Espécie tipo.

5.2 DETECÇÃO DE *F. pedrosoi* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS.

As 87 amostras ambientais previamente utilizadas para isolamento foram processadas para detectar a presença de *F. pedrosoi* no DNA total, por reconhecimentos da sonda cadeado seguido de RCA. Quatro dentre 87 (4,59%) das amostras foram positivas para Sonda/RCA. Três amostras positivas são da região de Bacabeira, sendo duas de material em decomposição e uma de folha de *Solanum paniculatum*, popularmente conhecida como jurubeba e uma amostra de solo, coletada na cidade de Pinheiro. Todas as amostras positivas mostraram padrão de amplificação em escada quando visualizados em gel de agarose 2% (Figura 4).

FIGURA 4- AMOSTRAS AMBIENTAIS POSITIVAS PARA RCA.



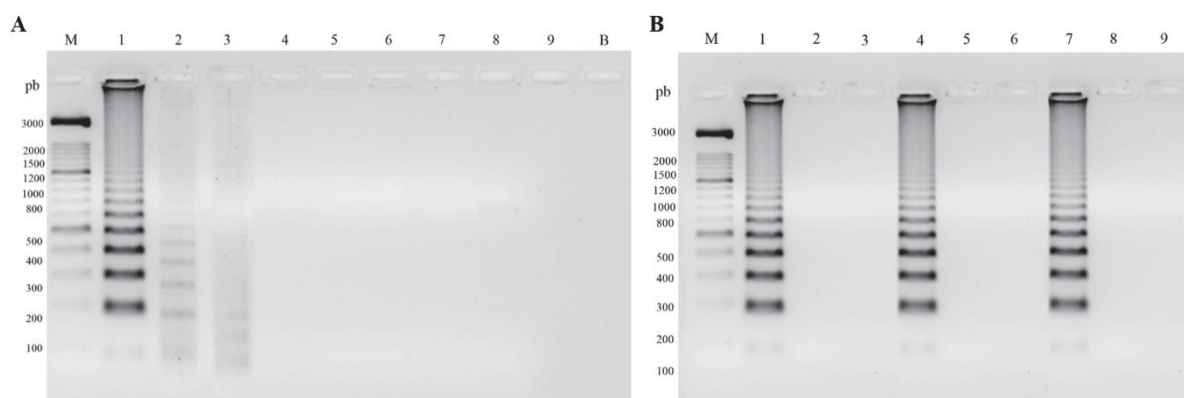
M. Marcador de peso molecular 1 kb. C+. Controle positivo da reação, *F. pedrosoi*. C- Controle negativo da reação, *F. erecta*. Amostras positivas: 1-Material em decomposição. 2-Material em decomposição. 7-Folha de *Solanum paniculatum*. 76-Solo. Padrão de escada: positivo. Fundo limpo: negativo. As setas indicam as amostras positivas.

4.2.1 Sensibilidade e Especificidade

O teste de sensibilidade do método de RCA foi determinado utilizando várias concentrações do DNA de *F. pedrosoi* como modelo. Os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 mostraram um produto de aproximadamente 644 pb. O nível de sensibilidade da sonda cadeado aliada a RCA para detectar *F. pedrosoi* foi de $2,88 \times 10^7$ cópias do DNA purificado (Figura 5A).

O teste de especificidade *in silico*, mostrou que das 200 sequências da região ITS de diferentes espécies de fungos e da planta *M. pudica* analisadas, não ocorreu reconhecimento inespecífico dos nucleotídeos que compõe a sonda cadeado. As análises de especificidade *in vitro* demonstraram que a sonda cadeado aliada a RCA tem reconhecimento específico apenas para a espécie *F. pedrosoi*, sem reações de cruzadas com espécies fúngicas de referência avaliadas, sendo elas *F. monophora* (CBS 269.37), *F. nubica* (CBS 125.198), *F. erecta* (CBS 125763), *F. pugnacius* (CBM 49), *Candida albicans* (CMRP816), *Penicillium citrinum* (CMRP1538) e *Aspergillus nidulans*. A presença do material vegetal, solo e demais componentes do DNA total, não foram interferentes na especificidade de reconhecimento da sonda cadeado e da amplificação por RCA, como demonstraram as análises *in vitro* e *in vivo* (Figura 5B).

FIGURA 5-TESTE DE SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DE RCA



(A) Sensibilidade DNA da região ITS de *F. pedrosoi* (CBS 271.37). Coluna M: Marcador de Peso Molecular 1 Kb; Coluna B – Branco; Colunas 1 a 9 – $2,88 \times 10^9$, $2,88 \times 10^8$, $2,88 \times 10^7$, $2,88 \times 10^6$, $2,88 \times 10^5$, $2,88 \times 10^4$, $2,88 \times 10^3$, $2,88 \times 10^2$, $2,88 \times 10^1$ cópias por tubo respectivamente. (B) Especificidade de RCA em amostras de DNA de plantas e solo. As amostras 1 a 3 mostram são DNA total de plantas contaminadas com *F. pedrosoi*; *F. monophora*; *F. erecta* respectivamente. As amostras 4 a 6 são compostas por DNA total do solo contaminada com *F. pedrosoi*; *F. monophora*; *F. erecta*, respectivamente. As amostras 7 a 8 são do DNA total de *Bactris gasipaes* cultivada em vaso após infecção por *F. pedrosoi*; *F. monophora*; *F. erecta*, respectivamente.

4.2.2 Re-isolamento por método de cultura

Amostras positivas foram submetidas aos re-isolamento por flotação em óleo-mineral onde foi possível recuperar 19 fungos negros. Entretanto nenhum dos isolados apresentava características morfológicas semelhantes a *F. pedrosoi*. Os DNAs dos isolados foram testados com a sonda cadeia de *F. pedrosoi* e todos foram negativos. O sequenciamento da região ITS demonstrou que estes estavam agrupados ao longo das ordens Chaetothyriales e Dothideales, e não foi possível sua identificação em nível de gênero.

6 DISCUSSÃO

A epidemiologia da cromoblastomicose sugere que os agentes etiológicos da doença estão presentes no ambiente, e a infecção é acidental. Entretanto, De Hoog et al. (2007) mostra que isolados de plantas vivas, identificados como *Cladophialophora yegresii* são muito próximas da espécie patogênica *C. carrionii*, e ambas apresentam perfil de patogenicidade distinta, com capacidade de desenvolverem células muriformes quando inoculadas artificialmente em cactos. Os resultados de Vicente et al. (2014) sugerem que espécies estritamente próximas as linhagens patogênicas do gênero *Fonsecaea*, sendo eles *F. erecta* e *F. mínima*, estão associados a plantas, porém a relação dos agentes de cromoblastomicose com esse substrato permanece desconhecida. Neste estudo, oito isolados apresentaram morfologia semelhante aos agentes de cromoblastomicose dos gêneros *Fonsecaea* e *Cyphellophora*, confirmadas por estudos taxonômicos como *F. multimorphosa*, *F. brasiliensis*, *C. ambigua* e *C. guayanensis*. *C. guayanensis* é uma espécie isolada de material vegetal recentemente adicionada ao gênero (DECOCK et al., 2003), enquanto *C. ambigua*, anteriormente referida como *Phialophora ambigua* está associada a lesões em unhas dos pés (FENG et al., 2012; GOMES et al., 2016). Neste estudo o gênero *Fonsecaea* está representado pelas espécies *F. multimorphosa*, da qual apenas a linhagem CBS 980.96 foi relatada como agente de doença disseminada em gato (NAJAFZADEH et al., 2011) e *F. brasiliensis* CBS 119710 foi relatada associada a doença letárgica em caranguejos (VICENTE et al., 2012), enquanto as demais linhagens de ambas as espécies são ambientais (VICENTE et al., 2014).

Para investigação das fontes ambientais de *F. pedrosoi* por RCA, os substratos relatados como fonte de infecção foram coletados, incluindo espinhos de plantas. A especificidade do método mostrou que apenas o DNA de *F. pedrosoi* foi reconhecido pela

sonda cadeado desenvolvida por Najafzadeh et al. (2011), enquanto resultados negativos foram demonstrados em outros fungos. As análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* confirmam a especificidade e aplicabilidade do método em ensaios ambientais para detecção de *F. pedrosoi* (TSUI et al., 2011) como anteriormente demonstrado em outros agentes tais como *Sporothrix* spp. (RODRIGUES et al., 2016), *Fusarium graminearum* (DAVARI et al., 2012) e *Histoplasma capsulatum* (FURUIE et al., 2016). A sensibilidade de detecção do método foi de 2.88×10^7 cópias de DNA do fungo de interesse, com diminuição do sinal de amplificação quando concentrações menores de DNA estavam disponíveis. A diminuição da intensidade do sinal foi relatada por Furuie et al. (2016) e não observado por Rodrigues et al. (2016), entretanto a sonda de *F. pedrosoi* apresentou limite de detecção maior do DNA de interesse em comparação a ambos os trabalhos citados.

A recuperação de *F. pedrosoi* em substratos ambientais tem sido relatada em poucos estudos (MARQUES et al., 2006; SALGADO et al., 2004; VICENTE et al., 2001, 2008, 2014), sendo que em alguns deles, os isolados foram identificados apenas por caracterização morfológica (SALGADO et al., 2004), demonstrando que apesar do esforço amostral, a recuperação de linhagens patogênicas ambientais é restrita. Sabe-se que a infecção ambiental é a hipótese epidemiológica mais significativa para a cromoblastomicose visto que o quadro clínico está frequentemente associado ao trauma com material vegetal e a doença ser considerada uma micose de implantação (DENG et al., 2015; BADALI et al., 2010; QUEIROZ-TELLES et al., 2011). De acordo com os resultados deste estudo, foi observado que uma amostra de folha dos fragmentos vegetais analisados foi positiva para a sonda/RCA, além de duas de material em decomposição e uma de solo. As amostras positivas para sonda/RCA foram processadas para isolamento de *F. pedrosoi*, porém o agente *F. pedrosoi* não pode ser recuperado pelo método de cultura utilizado.

Com base nos resultados obtidos pelo método de isolamento e RCA, demonstramos que as espécies do gênero *Fonsecaea* estão presentes em pequenas concentrações em substratos ambientais, com maior associação ao material em decomposição, confirmando a natureza saprobia do gênero (MARQUES et al., 2006, VICENTE et al., 2014). Entretanto, a espécie *F. pedrosoi*, agente de cromoblastomicose, só foi detectada pelo método molecular, com maior frequência na matéria em decomposição (50% das amostras positivas). Embora esse seja o primeiro relato de detecção por método molecular do agente de cromoblastomicose *F. pedrosoi* na planta (*Solanum paniculatum*, jurubeba), os resultados demonstram que este pode não ser o nicho específico deste patógeno, uma vez que não foi detectada a presença deste nos demais fragmentos analisados (caule e espinho), da mesma planta. No entanto, a

existencia destes agentes em plantas vivas, pode justificar sua frequente transmissão via truma causada por plantas.

Além disso, considerando a alta sensibilidade da sonda, estes resultados demonstram que os agentes da cromoblastomicose estão presentes em baixas concentrações nos seus nichos ambientais o que dificulta sua recuperação por métodos de isolamento seletivo. A inviabilidade da recuperação de fungos patogênicos de amostras positivas em métodos moleculares foi também evidenciada por Norkaew et al. (2013). Assim, o ensaio de sonda cadeado aliado a RCA proposto por este estudo representa uma ferramenta importante de detecção de patógenos de amostras ambientais, contribuindo na seleção específica de substratos para posterior isolamento seletivo e recuperação do patógeno, representando uma ferramenta efetiva para estudos de epidemiologia e estabelecimento de rotas de infecção.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, os dados obtidos mostraram que a sonda cadeado aliada ao método de RCA representa uma ferramenta eficiente com sensibilidade e reprodutibilidade na detecção específica de *F. pedrosoi* em substratos ambientais, tal como plantas, solo e material em decomposição. A utilização da sonda representa uma ferramenta adicional para a identificação destes agentes onde a recuperação por isolamento em óleo mineral não foi possível.

8 REFERENCIAS

- ATKINS, S.D.; CLARCK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n.1, p.3-15, 2004.
- DAVARI, M.; VAN DIEPENINGEN, A.D.; BADAI-AHARI, A.; ARZANLOU, M.; NAJAFZADEH, M. J.; VAN DER LEE, T.A.J.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, p. 63–70, 2012.
- DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 4. ed. Utrecht: Universitat Rovira i Virgili, 2014. Disponível em: <http://www.clinicalfungi.org/>. Acesso em: março de 2018.
- DE HOOG, G.S.; NISHIKAKU, A.S.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; PADÍN-GONZÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p.219–234, 2007.
- DECOCK, C.; DELGADO-RODRIGUEZ, G.; BUNCHET, S.; SENG, J.M. A new species and three new combinations in *Cyphellophora*, with a note on the taxonomic affinities of the genus, and its relation to *Kumbhamaya* and *Pseudomicrodochium*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.209 –216, 2003
- DENG, S.; TSUI, C.K.M.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; YANG, L.; NAJAFZADEH, M.J.; BADALI, H.; LI, R.; HAGEN, F.; MEIS, J.F.; SUN, J.; DOLATABADI, S.; PAPIEROK, B.; PAN, W.; DE HOOG, G.S.; LIAO, W. Global spread of human chromoblastomycosis is driven by recombinant *Cladophialophora carrionii* and predominantly clonal *Fonsecaea* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, p.e0004004, 2015.
- FENG, P.; LU, O.; NAJAFZADEH, M.J.; VAN DEN ENDE, A.H.G.G.; SUN, J.; LI, R.; XI, L.; VICENTE, V.A.; LAI, W.; LU, C.; DE HOOG, G.S. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. **Fungal Diversity**, 2012.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília. 1995.
- FURUIE, J.L.; SUN, J.; DO NASCIMENTO, M.F.; GOMES, R.R.; WACULICZ-ANDRADE, C. E.; SESSEGOLO, G. C.; RODRIGUES, A.M.; GALVÃO-DIAS, M.A.; DE CAMARGO, Z.P.; QUEIROZ-TELLES, F.; NAJAFZADEH, M.; DE HOOG, S.G.; VICENTE, V. A. Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using rolling circle amplification. **Mycoses**, v.59, p.12–19, 2016.
- GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; AZEVEDO, C. M. P. S.; SALGADO, C. G.; SILVA, M. B.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; ANDRADE, T. S.; TAKAGI, E. H.; CRUZ, K. S.; FORNARI, G.; HAHN, R. C.; SCROFERNEKER, M. L.; CALIGNE, R. B.; RAMIREZ-CASTRILLON, M.; ARAÚJO, D. P.; HEIDRICH, D.;

COLOMBO, A. L.; DE HOOG, G. S. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

IRINYI, L.; LACKNER, M.; DE HOOG, S.; WIELAND, M. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. **Fungal Biology**, v. 120, p. 125–136. 2016.

IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v. 75, p. 149–158; 1981.

MARQUES, G. F.; BARRETO, J.A.; MASUDA, P. Y.; WACHHLOZ, P.A.; SOUSA, J.M.P. Clinical and demographic profile of chromoblastomycosis in a referral service in the midwest of São Paulo state (Brazil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, p.140-2, 2015.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, G. S.; Rapid detection and identification of fungal pathogens by rolling circle amplification (RCA) using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, v.54, p. 577-582, 2011.

NAJAFZADEH, M.J.; VICENTE, V.A.; SUN, J.; MEIS, J.F.; DE HOOG, G.S. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. **Fungal Biology**, v.115, p.1066-1076, 2011.

NASCIMENTO, M.M.F.; VICENTE, V.A.; BITTENCOURT, J.V.M.; GELINSKI, J.M.L.; PRENAFA-BOLDÚE, F.; ROMERO-GUIZAE, M.; FORNARI, G.; GOMES, R.R.; SANTOS, G.D.; VAN DEN ENDE, A.H.G.; AZEVEDO, C.D.M.P.S.; DE HOOG, G.S. Diversity of opportunistic black fungi on babassu coconut shells, a rich source of esters and hydrocarbons. **Fungal Biology**, v. 121, p. 488-500, 2017.

NILSON, M.; MALMGREN, H.; SAMIOTAKI, M.; KWIATKOWSKI, M.; CHOWDHARY, B.P.; LANDEGREN, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. **Science**, v. 265, 1994.

NORKAEW, T.; OHNO, H.; SRIBUREE, P.; TANABE, K.; THARAVICHITKUL, P.; TAKARN, P.; PUENGCHAN, T.; BUMRUNGSRI, S.; MIYAZAKE, Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by Nested PCR. **Mycopathologia**, 2013.

O'DONNELL, K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). **Current Genetics**, v. 22, p. 213-320, 1992.

QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, S.G.; SANTOS, D.C.; SALGADO, C.G.; VICENTE, V.A.; BONIFAZ, A.; ROILIDES, E.; XI, L.; AZEVEDO, A.M.P.; SILVA, M.B.; PANA, Z.D.; COLOMBO, A.L.; WALSH, T. J. Cromoblastomycosis: a neglected global disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, p. 233-276, 2017

RODRIGUES, A.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; DE CAMARGO, Z. P. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers Microbiology**, v.6, p.1385, 2015.

SALGADO, C.G.; SILVA, J.P.; DINIZ, J.A.P.; SILVA, M.B.; COSTA, P.F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U.I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p.33-36, 2004.

SEYEDMOUSAVI, S.; NETEA, G.M.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.; DE HOOG, G. S. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p. 527–542, 2014.

SUDHADHAM, M.; HOOG, G.S. DE; MENKEN, S.B.J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; SIHANONTH, P. Rapid screening for genotypes as possible markers of virulence in the neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* using PCR-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 138–142, 2010.

SUN, J.; NAJAFZADH, M.J.; VICENTE, V.A.; XI, L.; DE HOOG, G.S. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p.19-24, 2010.

TEHRANI, S.J.; ALIABADIAN, M.; FATA, A.; NAJAFZADEH, M. J. Rolling circle amplification (RCA): an approach for quick detection and identification of fungal species. **Journal of Mycology Research**, v. 1, p. 55-62, 2014.

TEIXEIRA, M.M.; MORENO, L.F.; STIELOW, B. J.; MUSZEWSKA, A.; HAINAUT, M.; GONZAGA, L.; ABOUELLEIL, A.; PATANÉ, J.S.L.; PRIEST, M.; SOUZA, R.; YOUNG, S.; FERREIRA, K.S.; ZENG, Q.; DA CUNHA, M.M.L.; GLADKI, A.; BARKER, B.; VICENTE, V.A.; DE SOUZA, E.M.; ALMEIDA, S.; HENRISSAT, B.; VASCONCELOS, A.T.R.; DENG, S.; VOGLMAYR, H.; MOUSSA, T.A.A.; GORBUSHINA, A.; FELIPE, M. S.S.; CUOMO, C. A.; DE HOOG, G. S. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1–28, 2017.

TSUI, C.K.M.; WOODHALL, J.; CHEN, W.; LEVESQUE, C.A.; LAU, A.; SCHOENS, C.D.; BACHIENS, C.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. **IMA Fungus**, v. 2, p.177-189, 2011.

VAN ELSAS, J.D.; BOERSMA F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 77-87, 2011.

VICENTE, V. A.; RIBEIRO, O.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; GUERRA, R.S.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.; DE HOOG, G.S.; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with lethargic crab disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v. 158, p.109–122, 2012.

VICENTE, V.A.; ANGELIS, D.A.; QUEIROZ-TELLES, F.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Isolation of herpotrichiellaceous fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.47-51, 2001

VICENTE, V.A.; ATTILI-AGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A.

Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.

VICENTE, V.A.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; ROMES, R.R.; ROBL, D.; MARQUES, S.G.; AZEVEDO, C.M.P.S.; DE HOOG, G.S. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2014.

VICENTE, V.A.; WEISS, V.A.; BOMBASSARO, A.; MORENO, L. F.; COSTA, F. F.; RAITTZ, R.T.; LEÃO, A.C.; GOMES, R.R.; BOCCA, A.L.; FORNARI, G.; DE CASTRO, R.J.A.; SUN, J.; FAORO, H.; TADRA-SFEIR, M.Z.; BAURA, V.; BALSANELLI, E.; ALMEIDA, S.R.; DOS SANTOS, S.S.; TEIXEIRA, M.D.M.; SOARES, F.M.S.; DO NASCIMENTO, M.M.F.; PEDROSA, F.O.; STEFFENS, M.B.; ATTILI-ANGELIS, D.; NAJAFZADEH, M.J.; QUEIROZ-TELLES, F.; SOUZA, E.M.; DE HOOG, G. S. Comparative genomics of sibling species of *Fonsecaea* associated with human chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.1924, 2017.

WALKER, D.H.; MCGINNIS, M.R. Diseases caused by fungi. **Pathobiology of Human Disease**, 2014.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, p. 315-322. Academic Press: San Diego, U.S.A., 1990.

CAPÍTULO III- CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo teve por objetivo propor um ensaio molecular baseado em sonda cadeado e RCA (NAJAFZADEH et al., 2011), para bioprospecção do agente de cromoblastomicose *F. pedrosoi*, aplicável no DNA total de amostras de solo, material em decomposição, folha, espinhos e caule de plantas, como ferramenta adicional ao método de isolamento seletivo por flotação em óleo mineral. O estudo foi baseado na hipótese atual da inoculação traumática com detritos vegetais frequentemente relatados por pacientes como provável via de infecção da cromoblastomicose. A hipótese, porém, contrapõe os dados demonstrados por estudos de isolamento, devido à restrita recuperação de agentes de cromoblastomicose dos substratos vegetais, especialmente em fragmentos das plantas indicadas pelos pacientes como substrato de infecção (DE HOOG et al., 2007; VICENTE et al., 2014).

Dados epidemiológicos da doença são baseados em dados clínicos. Por se tratar de uma micose crônica, negligenciada e de notificação não obrigatória, que atinge principalmente populações isoladas e de baixa renda, muitos pacientes procuram ajuda clínica muitos anos após a infecção. Assim, restringir dados epidemiológicos a dados clínicos exige cautela. Os dados atuais demonstram que espécies sapróbias e oportunistas ocorrem em um mesmo ambiente (SALGADO et al., 2004; VICENTE et al., 2001; VICENTE et al., 2014). Entretanto, espécies sapróbias podem ser isoladas por método convencional, enquanto patógenos são selecionados apenas por métodos de enriquecimento ou dependem de um vetor animal para se desenvolver, por isso a necessidade de novos métodos que sejam capazes de selecionar agentes patogênicos (QUEIROZ-TELLES et al., 2017).

O método de sonda cadeado aliado a RCA, foi eficaz na detecção do DNA de *F. pedrosoi* em todos os substratos avaliados, demonstrando ser uma ferramenta promissora sem reações cruzadas e/ou falsos positivos no ensaio realizado. O limite de detecção do método foi avaliado em 2.88×10^7 cópias de DNA de interesse. O agente de cromoblastomicose, *F. pedrosoi*, foi detectado em 04 amostras do estado do Maranhão, sendo uma delas a folha de planta *Solanum paniculatum* (jurubeba), sendo este o primeiro relato de associação do fungo com a referida planta, bem como o primeiro relato de caracterização molecular da espécie patogênica *F. pedrosoi* em planta viva.

O método seletivo de flotação em óleo mineral foi aplicado às amostras ambientais coletadas. Um total de 175 isolados foi recuperado, e cinco linhagens foram agrupadas filogeneticamente ao gênero *Fonsecaea*, pela análise da região ITS, sendo uma da espécie *F.*

multimorphosa e uma *F. brasiliensis*, as demais estão agrupadas em um clado separado, próximo a *F. brasiliensis*. Análises multigênicas serão realizadas a fim de demonstrar as relações filogenéticas desses isolados com as espécies que compõe o gênero. Os demais isolados serão futuramente caracterizados e descritos, uma vez que representam uma fonte de diversidade fúngica existente nos substratos avaliados, e assim podem confirmar a ampla distribuição ambiental de fungos negros, presentes também na comunidade endofítica e epifítica das plantas. Devido à baixa competitividade frente o crescimento de fungos hialinos, fungos negros são muitas vezes inexploráveis, porém muitas espécies apresentam características biotecnológicas promissoras que poderão ser alvo de estudos posteriores.

Em conclusão, aliar a sensibilidade do método molecular ao isolamento contribui na redução de recursos investidos em trabalhos que exigem um grande esforço amostral e recuperam poucas linhagens patogênicas. Assim, a triagem molecular dos substratos analisados, contribui com a recuperação de linhagens clínicas de substratos ambientais, aplicáveis a estudos que avaliem a patogenicidade e virulência desses isolados, visto que a maioria das linhagens conhecidas atualmente tem sido isolada de amostras clínicas. A investigação da origem ambiental da cromoblastomicose, a recuperação ambiental e a caracterização do nicho das espécies envolvidas na doença deve ser um estudo contínuo visando reunir dados epidemiológicos confiáveis, baseado em dados clínicos e ambientais. Sabe-se que outras espécies do gênero *Fonsecaea* além de outros gêneros de leveduras negras estão associadas a cromoblastomicose. Assim, o ensaio de sonda cadeado aliado a RCA proposto neste estudo, pode ser reproduzido para ampliação da investigação dos demais agentes de cromoblastomicose e nichos ecológicos ocupados por estas espécies. Neste contexto, RCA aliado ao isolamento, contribui para a inferência a respeito de rotas de infecção e epidemiologia da cromoblastomicose.

REFERENCIAS

- AGARWAL, R.; SINGH, G.; GHOSH, A.; VERMA, K. K.; PANDEY, M., XESS, I. Chromoblastomycosis in India: Review of 169 cases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, p. 1-13, 2017.
- AHMED, S.A.; GERRITS VAN DEN ENDE, B.H.G.; FAHAL, A. H.; VAN DE SANDE, W.W.J.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of black grain eumycetoma causative agents using rolling circle amplification. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, p. e3368, 2014.
- ANDRADE, T.S.; CURY, A.E.; CASTRO, L.G.M.; HIRATA, M.H.; HIRATA, R.D.C. Rapid identification of *Fonsecaea* by duplex polymerase chain reaction in isolates from patients with chromoblastomycosis. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 57, p. 267-272, 2007.
- ANTSON, D.O.; ISAKSSON, A.; LANDEGREN, U.; NILSSON, M. PCR-generated padlock probes detect single nucleotide variation in genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. e58, 2000.
- ATKINS, S.D.; CLARCK, I.M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. **Journal of Applied Genetics**, v. 45, n.1, p.3-15, 2004.
- AVELAR-PIRES, C.; SIMOES-QUARESMA, J.A.; MACEDO, G.M.M.; XAVIER, M.B.; BRITO, A.C. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the Brazilian amazon region. **Archives of Medical Research**, v. 44, p.302-306, 2013.
- AZEVEDO, C.M.P.S.; GOMES, R.R.; VICENTE, V.A.; SANTOS, D.W.C.L.; MARQUES, S.G.; NASCIMENTO, M.M.F.; ANDRADE, C.E.W.; SILVA, R.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, G.S. *Fonsecaea pugnacius*, a novel agent of disseminated chromoblastomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n.8, 2015.
- BADALI, H.; BONIFAZ, A.; BARRÓN-TAPIA, T.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; ESTRADA-AGUILAR, L.; OLIVEIRA, N.M.C.; FILHOS, J.F.S.; GUARRO, J., MEIS, J.F.G.M.; DE HOOG, G.S. *Rhinocladiella aquaspersa*, proven agent of verrucous skin infection and a novel type of chromoblastomycosis. **Medical Mycology**, v. 48, p. 696–703, 2010.
- BADALI, H.; GUEIDAN, C.; NAJAFZADEH, M.J.; BONIFAZ, A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; DE HOOG, G.S. Biodiversity of the genus *Cladophialophora*. **Studies in Mycology**, vol. 61, p. 175–191, 2008.
- BAKHT, S.; QI, X. Ligation-mediated rolling-circle amplification-based approaches to single nucleotide polymorphism detection. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v.5, p. 111–116, 2005.
- BERTAUX, J.; GLOGER, U.; SCHMID, M.; HARTMANN, A.; SCHEU, S. Routine fluorescence in situ hybridization in soil. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p.451–460, 2007.

BLASI, B.; POYNTNER, C.; RUDAVSKY, T.; PRENAFETA-BOLDÚ, F.X.; DE HOOG, G.S.; TAFER, H.; STERFLINGER, K. Pathogenic yet environmentally friendly? Black fungal candidates for bioremediation of pollutants. **Geomicrobiology Journal**, v.33, p. 308–317, 2016.

BONIFAZ, A.; VÁZQUEZ-GONZÁLEZ, D.; PERUSQUÍA-ORTIZ, A.M. Subcutaneous mycoses: chromoblastomycosis, sporotrichosis and mycetoma. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v.8, n.8, p. 619-27, 2010.

BRUMFIELD, R.T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D.A.; EDWARDS, S.W. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, p.249-256, 2003.

BRUN, S.; ZUMELZU, C.; HOANGANH, M.; LEVY, A.; GARCIA-HERMOSO, D.; LAROCHE, L.; IZRI, A. First case of chromoblastomycosis from Bangladesh. **Medical Mycology**, v.10, p.1–3, 2015.

CARACCIOLO, A.B.; BOTTONI, P.; GRENNI, P. Fluorescence in situ hybridization in soil and water ecosystems: A useful method for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v.92, p.567-579, 2014.

CHAABANE, H.; MSEDDE, M.; CHARFI, S.; CHAARI, I.; BOUDAWARA, T.; TURKI, H. Chromoblastomycose: lésion solitaire du sein. **La Presse Médicale**, v.44, n.7–8, 2015.

CHO, J.C.; TIEDJE, J.M. Quantitative detection of microbial genes by using DNA microarrays. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1425–1430, 2002.

CHOWDHARY, A.; PERFECT, J.; DE HOOG, G. S. Black molds and melanized yeasts pathogenic to humans. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, p. 1-21, 2014.

DAVARI, M.; VAN DIEPENINGEN, A.D.; BADAI-AHARI, A.; ARZANLOU, M.; NAJAFZADEH, M. J.; VAN DER LEE, T.A.J.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of *Fusarium graminearum* species complex using Rolling Circle Amplification (RCA). **Journal of Microbiological Methods**, v. 89, p. 63–70, 2012.

DE HOOG, G. S.; GUARRO, J.; GENÉ, J.; FIGUERAS, M. J. **Atlas of clinical fungi**. 4. ed. Utrecht: Universitat Rovira i Virgili, 2014. Disponível em: <http://www.clinicalfungi.org/>. Acesso em: março de 2018.

DE HOOG, G.S.; NISHIKAKU, A.S.; FERNANDEZ-ZEPPEFELDT, G.; PADÍN-GONZÁLEZ, C.; BURGER, E.; BADALI, H.; RICHARD-YEGRES, N.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G. Molecular analysis and pathogenicity of the *Cladophialophora carrionii* complex, with the description of a novel species. **Studies in Mycology**, v. 58, p.219–234, 2007.

DE HOOG, S.G.; ATTILI-ANGELIS, D.; VICENTE, V.A.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; QUEIROZ-TELLES, F. Molecular ecology and pathogenic potential of *Fonsecaea* Species. **Medical Mycology**, v. 42, p. 405-416, 2004.

DE PAZ, H. D.; BROTONS, P.; MUNHÖZ-ALMAGRO, C. Molecular isothermal techniques for combating infectious diseases: towards low-cost point-of-care diagnostics. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 14, 827–843. 2014.

DECOCK, C.; DELGADO-RODRIGUEZ, G.; BUNCHET, S.; SENG, J.M. A new species and three new combinations in *Cyphellophora*, with a note on the taxonomic affinities of the genus, and its relation to *Kumbhamaya* and *Pseudomicrodochium*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v.84, p.209–216, 2003

DEEPAK, S.A.; KOTTAPALLI, K.R.; RAKWAL, R.; OROS, G.; RANGAPPA, K.S.; IWAHASHI, H.; MASUO, Y.; AGRAWAL, G.K. Real-Time PCR: Revolutionizing detection and expression analysis of genes. **Current Genomics**, v.8, p. 234-251, 2007

DENG, S.; TSUI, C.K.M.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; YANG, L.; NAJAFZADEH, M.J.; BADALI, H.; LI, R.; HAGEN, F.; MEIS, J.F.; SUN, J.; DOLATABADI, S.; PAPIEROK, B.; PAN, W.; DE HOOG, G.S.; LIAO, W. Global spread of human chromoblastomycosis is driven by recombinant *Cladophialophora carrionii* and predominantly clonal *Fonsecaea* species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.9, p.e0004004, 2015.

EICKHORST, T.; TIPPKOTTER, R. Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 1284–1293, 2008.

FENG, P.; LU, O.; NAJAFZADEH, M.J.; VAN DEN ENDE, A.H.G.G.; SUN, J.; LI, R.; XI, L.; VICENTE, V.A.; LAI, W.; LU, C.; DE HOOG, G.S. *Cyphellophora* and its relatives in *Phialophora*: biodiversity and possible role in human infection. **Fungal Diversity**, 2012.

FERREIRA, M. E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. EMBRAPA-CENARGEN, Brasília. 1995.

FESSEHAIE, A.; DE BOER, S.H.; LÉVESQUE, A. An oligonucleotide array for the identification and differentiation of bacteria pathogenic on potato. **Phytopathology**, v.93, n.3, p.262-269, 2003.

FORCHE, A.; MAGEE, P.T.; MAGEE, B.B.; MAY, G. Genome-wide single-nucleotide polymorphism map for *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 3, p. 705-714, 2004.

FRANZEN, A.J.; CUNHA, M. M. L.; MIRANDA, K.; HENTSCHEL, J.; PLATTNER, H.; DA SILVAM.B.; SALGADO,C.G.; SOUZA,W.; ROZENTAL,S. Ultrastructural characterization of melanosomes of the human pathogenic fungus *Fonsecaea pedrosoi*. **Journal of Structural Biology**, v.162, p.75–84, 2008.

FURUIE, J.L.; SUN, J.; DO NASCIMENTO, M.F.; GOMES, R.R.; WACULICZ-ANDRADE, C. E.; SESSEGOLO, G. C.; RODRIGUES, A.M.; GALVÃO-DIAS, M.A.; DE CAMARGO, Z.P.; QUEIROZ-TELLES, F.; NAJAFZADEH, M.; DE HOOG, S.G.; VICENTE, V. A. Molecular identification of *Histoplasma capsulatum* using rolling circle amplification. **Mycoses**, v.59, p.12–19, 2016.

- GEZUELE, E.; MACKINNON, J. E.; CONTI-DÍAZ, I. A. The frequent isolation of *Phialophora verrucosa* and *Phialophora pedrosoi* from natural sources. **Sabouraudia**, v.10, p. 266-273. 1972.
- GOMES, R. R.; VICENTE, V. A.; AZEVEDO, C. M. P. S.; SALGADO, C. G.; SILVA, M. B.; QUEIROZ-TELLES, F.; MARQUES, S. G.; SANTOS, D. W. C. L.; ANDRADE, T. S.; TAKAGI, E. H.; CRUZ, K. S.; FORNARI, G.; HAHN, R. C.; SCROFERNEKER, M. L.; CALIGNE, R. B.; RAMIREZ-CASTRILLON, M.; ARAÚJO, D. P.; HEIDRICH, D.; COLOMBO, A. L.; DE HOOG, G. S. Molecular epidemiology of agents of human chromoblastomycosis in Brazil with the description of two novel species. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 2016.
- GONZÁLEZ, G. M.; ROJAS, O.C.; GONZÁLEZ, J.G.; KANG, Y.; DE HOOG, G.S. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella aquaspersa*. **Medical Mycology Case Reports**, v. 2, p.148–151, 2013.
- HAMZEHEI, H.; YAZDANPARAST, S.A.; DAVOUDI, M.M.; KHODAVAISY, S.; GOLEHKHEYLI, M.; ANSARI, S.; DE HOOG, G.S.; BADALI, H. Use of rolling circle amplification to rapidly identify species of *Cladophialophora* potentially causing human infection. **Mycopathologia**, v. 175, p. 431-438; 2013.
- HARRIS, J.E.; SUTTON, D.A.; RUBIN, A.; WICKES, B.; DE HOOG, G.S.; KOVARIK, C. *Exophiala spinifera* as a cause of cutaneous phaeohyphomycosis: case study and review of the literature. **Medical Mycology**, v. 47, p. 87–93, 2009.
- HEIDRICH, D.; GONZÁLEZ, G.M.; PAGANIC, D.M.; RAMÍREZ-CASTRILLÓN, M.; SCROFERNEKERA, M. L. Chromoblastomycosis caused by *Rhinocladiella similis*: Case report. **Medical Mycology Case Reports**, v.16, p. 25–27, 2017
- HEINRICHS, G.; DE HOOG, G. S.; HAASEA, G. Barcode identifiers as a practical tool for reliable species assignment of medically important black yeast species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, p.3023–3030, 2012.
- IRINYI, L.; LACKNER, M.; DE HOOG, S.; WIELAND, M. DNA barcoding of fungi causing infections in humans and animals. **Fungal Biology**, v. 120, p. 125–136. 2016.
- IWATSU, T.; MIYAJI, M.; OKAMOTO, S. Isolation of *Phialophora verrucosa* and *Fonsecaea pedrosoi* from nature in Japan. **Mycopathologia**, v. 75, p. 149–158; 1981.
- KEHOE, D.M.; VILLAND, P.; SOMERVILLE, S. DNA microarrays for studies of higher plants and other photosynthetic organisms. **Trends in Plant Science**, v. 4, p.38-41, 1999.
- LACKNER, M.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; LU, O.; DE HOOG, G.S. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 126–133, 2012.
- LIBERT, X.; CHASSEUR, C.; PACKEU, A.; BUREAU, F.; ROOSENS, N. H.; DE KEERSMAECKER, S. J. C. A molecular approach for the rapid, selective and sensitive detection of *Exophiala jeanselmei* in environmental samples: development and performance

assessment of a real-time PCR assay. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 1377–1392, 2016.

LIEVENS, B.; BROUWER, M.; VANACHTER, A.C.R.C; CAMMUE, B.P.A.; THOMMA, B.P.H.J. Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples. **Plant Science**, v.171, p.155–165, 2006.

MARQUES, G. F.; BARRETO, J.A.; MASUDA, P. Y.; WACHHLOZ, P.A.; SOUSA, J.M.P. Clinical and demographic profile of chromoblastomycosis in a referral service in the midwest of São Paulo state (Brazil). **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, p.140-2, 2015.

MARQUES, S.G.; SILVA, C.M.P.; SALDANHA, P.C.; REZENDE, M.A.; VICENTE, V.A.; QUEIROZ-TELLES, F.; COSTA, J.M.L.; Isolation of *Fonsecaea* from the shell of the babassu coconut (*Orbygnia phalerata* Martius) in the Amazon region of Maranhão Brazil. **Japanese Journal of Medical Mycology**, vol. 47, n.4; 2006.

MCGRATH, K.C.; MONDAV, R.; SINTRAJAYA, R.; SLATTERY, B.; SCHMIDT, S.; SCHENK, P.M. Development of an environmental functional gene microarray for soil microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, p. 7161–7170, 2010.

NAJAFZADEH, M. J.; DOLATABADI, S.; SARADEGHI KEISARI, M.; NASERI, A.; FENG, P.; DE HOOG, G. S. Detection and identification of opportunistic *Exophiala* species using the rolling circle amplification of ribosomal internal transcribed spacers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, p. 338–342, 2013.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE V.A.; XI, L.; GERRITS VAN DEN ENDE, A. H. G.; DE HOOG, G. S. *Fonsecaea nubica* sp. nov, a new agent of human chromoblastomycosis revealed using molecular data. **Medical Mycology**, v. 48, p. 800–806, 2010.

NAJAFZADEH, M. J.; SUN, J.; VICENTE, V. A.; DE HOOG, G. S. Rapid detection and identification of fungal pathogens by rolling circle amplification (RCA) using *Fonsecaea* as a model. **Mycoses**, v.54, p. 577-582, 2011.

NAJAFZADEH, M.J.; VICENTE, V.A.; SUN, J.; MEIS, J.F.; DE HOOG, G.S. *Fonsecaea multimorphosa* sp. nov, a new species of Chaetothyriales isolated from a feline cerebral abscess. **Fungal Biology**, v.115, p.1066-1076, 2011.

NASCIMENTO, M.M.F.; VICENTE, V.A.; BITTENCOURT, J.V.M.; GELINSKI, J.M.L.; PRENAFA-BOLDÚE, F.; ROMERO-GUIZAE, M.; FORNARI, G.; GOMES, R.R.; SANTOS, G.D.; VAN DEN ENDE, A.H.G.; AZEVEDO, C.D.M.P.S.; DE HOOG, G.S. Diversity of opportunistic black fungi on babassu coconut shells, a rich source of esters and hydrocarbons. **Fungal Biology**, v. 121, p. 488-500, 2017.

NILSON, M.; MALMGREN, H.; SAMIOTAKI, M.; KWIATKOWSKI, M.; CHOWDHARY, B.P.; LANDEGREN, U. Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. **Science**, v. 265, 1994.

NIMRICHTER, L.; CERQUEIRA, M.D.; LEITÃO, E.A.; MIRANDA, K.; NAKAYASU, E.S.; ALMEIDA, S.R.; ALMEIDA, I.C.; ALVIANO, C.S.; BARRETO-BERGTER, E.;

RODRIGUES, M.L. Structure, cellular distribution, antigenicity, and biological functions of *Fonsecaea pedrosoi* ceramide monohexosides. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 7860–7868, 2005.

NORKAEW, T.; OHNO, H.; SRIBUREE, P.; TANABE, K.; THARAVICHITKUL, P.; TAKARN, P.; PUENGCHAN, T.; BUMRUNGSRI, S.; MIYAZAKE, Y. Detection of environmental sources of *Histoplasma capsulatum* in Chiang Mai, Thailand, by Nested PCR. **Mycopathologia**, 2013.

O'DONNELL, K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). **Current Genetics**, v. 22, p. 213-320, 1992.

PIRES, C.A.; QUARESMA, J.A.S.; DE MACEDO, G.M.M.; XAVIER, M.B.; DE BRITO, A.C. Revisiting the clinical and histopathological aspects of patients with chromoblastomycosis from the Brazilian Amazon region. **Archives of Medical Research**, v. 44, p.302-306, 2013.

QUEIROZ-TELLES, F. Chromoblastomycosis, a neglected tropical disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.57, 2015

QUEIROZ-TELLES, F.; DE HOOG, S.G.; SANTOS, D.C.; SALGADO, C.G.; VICENTE, V.A.; BONIFAZ, A.; ROILIDES, E.; XI, L.; AZEVEDO, A.M.P; SILVA, M.B.; PANA, Z.D.; COLOMBO, A.L.; WALSH, T. J. Chromoblastomycosis: a neglected global disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, p. 233-276, 2017.

QUEIROZ-TELLES, F.; ESTERRE, P.E.; PEREZ-BLANCO, M.; VITALE, R.; SALGADO, C. G.; BONIFAZ, A. Chromoblastomycosis: an overview of clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Medical Mycology**, v. 47, p. 3-15, 2009.

QUEIROZ-TELLES, F.; SANTOS, D.W.C.L. Chromoblastomycosis in the Clinical Practice. **Current Fungal Infection Reports**, v.6, p.312-9, 2012.

RODRIGUES, A.M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; DE CAMARGO, Z. P. Rapid identification of emerging human-pathogenic *Sporothrix* species with rolling circle amplification. **Frontiers Microbiology**, v.6, p.1385, 2015.

RUBIN, H. A.; BRUCE, S.; ROSEN, T.; MCBRIDE, M. E. Evidence for percutaneous inoculation as the mode of transmission for chromoblastomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 25, n.5, 1991.

SALGADO, C.G.; SILVA, J.P.; DINIZ, J.A.P.; SILVA, M.B.; COSTA, P.F.; TEIXEIRA, C.; SALGADO, U.I. Isolation of *Fonsecaea pedrosoi* from thorns of *Mimosa pudica*, a probable natural source of chromoblastomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p.33-36, 2004.

SANTOS, A.L.S.; PALMEIRA, V.F.; ROZENTAL, S.; KNEIPP, L.F.; NIMRICHTER, L.; ALVIANO, D.S.; RODRIGUES, M.L.; ALVIANO, C.S. Biology and pathogenesis of *Fonsecaea pedrosoi*, the major etiologic agent of chromoblastomycosis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, p.570-591, 2007.

SEYEDMOUSAVI, S.; GUILLOT, J.; DE HOOG, G. S. Phaeohyphomycoses, emerging opportunistic diseases in animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 19–35, 2013.

SEYEDMOUSAVI, S.; NETEA, G.M.; MOUTON, J. W.; MELCHERS, W. J. G.; VERWEIJ, P. E.; DE HOOG, G. S. Black yeasts and their filamentous relatives: principles of pathogenesis and host defense. **Clinical Microbiology Reviews**, v.27, p. 527–542, 2014.

SHI, D.; ZHANG, W.; LU, G.; DE HOOG, G.S.; LIANG, G.; MEI, H.; ZHENG, H.; SHEN, Y.; LIU, W. Chromoblastomycosis due to *Fonsecaea monophora* misdiagnosed as sporotrichosis and cutaneous tuberculosis in a pulmonary tuberculosis patient. **Medical Mycology Case Reports**, v.11, p.57–60, 2016.

SIBLEY, C.D.; PEIRANO, G.; CHURCH, D.L. Molecular methods for pathogen and microbial community detection and characterization: Current and potential application in diagnostic microbiology, Infection. **Genetics and Evolution**, v. 12, p.505-521, 2012.

SINGH, B. P.; GUPTA, V. K. **Molecular Markers in Mycology: Diagnostics and Marker**; Springer, 2017.

SIQUEIRA, I.M.; DE CASTRO R.J.A.; LEONHARDT, L.C.M.; JERÔNIMO, M.S.; SOARES, A.C.; RAIOL, T.; NISHIBE, C.; ALMEIDA, N.; TAVARES, A.H.; HOFFMANN, C.; BOCCA, A.L. Modulation of the immune response by *Fonsecaea pedrosoi* morphotypes in the course of experimental chromoblastomycosis and their role on inflammatory response chronicity. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.11, p. e0005461, 2017.

SMITH, C.J.; OSBORN, A.M. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v.67, p.6–20, 2009.

SOMOGYVARI, F.; HORVATH, A.; SERLY, J.; MAJOROS, H.; VAGVOLGYI, C.; PETO, Z. Detection of invasive fungal pathogens by Real-time PCR and high-resolution melting analysis. **In vivo**, v. 26, p. 979-984, 2012.

SUDHADHAM, M.; HOOG, G.S. DE; MENKEN, S.B.J.; GERRITS VAN DEN ENDE, A.H.G.; SIHANONTH, P. Rapid screening for genotypes as possible markers of virulence in the neurotropic black yeast *Exophiala dermatitidis* using PCR-RFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 138–142, 2010.

SUN, J.; NAJAFZADH, M.J.; VICENTE, V.A.; XI, L.; DE HOOG, G.S. Rapid detection of pathogenic fungi using loop-mediated isothermal amplification, exemplified by *Fonsecaea* agents of chromoblastomycosis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p.19-24, 2010.

TEHRANI, S.J.; ALIABADIAN, M.; FATA, A.; NAJAFZADEH, M. J. Rolling circle amplification (RCA): an approach for quick detection and identification of fungal species. **Journal of Mycology Research**, v. 1, p. 55-62, 2014.

TEIXEIRA, M.M.; MORENO, L.F.; STIELOW, B. J.; MUSZEWSKA, A.; HAINAUT, M.; GONZAGA, L.; ABOUELLEIL, A.; PATANÉ, J.S.L.; PRIEST, M.; SOUZA, R.; YOUNG, S.; FERREIRA, K.S.; ZENG, Q.; DA CUNHA, M.M.L.; GLADKI, A.; BARKER, B.; VICENTE, V.A.; DE SOUZA, E.M.; ALMEIDA, S.; HENRISSAT, B.; VASCONCELOS,

A.T.R.; DENG, S.; VOGLMAYR, H.; MOUSSA, T.A.A.; GORBUSHINA, A.; FELIPE, M. S.S.; CUOMO, C. A.; DE HOOG, G. S. Exploring the genomic diversity of black yeasts and relatives (Chaetothyriales, Ascomycota). **Studies in Mycology**, v. 86, p. 1–28, 2017.

TORRES-GUERRERO, E.; ISA-ISA, R.; ISA, M.; ARENAS, R. Chromoblastomycosis. **Clinics in Dermatology**, v.30, p.403-408, 2012.

TSUI, C.K.M.; WOODHALL, J.; CHEN, W.; LEVESQUE, C.A.; LAU, A.; SCHOENS, C.D.; BACHIENS, C.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S. Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. **IMA Fungus**, v. 2, p.177-189, 2011.

VAN ELSAS, J.D.; BOERSMA F.G.H. A review of molecular methods to study the microbiota of soil and the mycosphere. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 77-87, 2011.

VICENTE, V. A.; RIBEIRO, O.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; GUERRA, R.S.; MIESCH, S.; OSTRENSKY, A.; MEIS, J. F.; KLAASSEN, C. H.; DE HOOG, G.S.; BOEGER, W. A. Black yeast-like fungi associated with lethargic crab disease (LCD) in the mangrove-land crab, *Ucides cordatus* (Ocypodidae). **Veterinary Microbiology**, v. 158, p.109–122, 2012.

VICENTE, V.A.; ANGELIS, D.A.; QUEIROZ-TELLES, F.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Isolation of herpotrichiellaceous fungi from the environment. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.47-51, 2001

VICENTE, V.A.; ATTILI-AGELIS, D.; PIE, M.R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, M.; NAJAFZADEH, M.J.; DE HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.

VICENTE, V.A.; NAJAFZADEH, M.J.; SUN, J.; ROMES, R.R.; ROBL, D.; MARQUES, S.G.; AZEVEDO, C.M.P.S.; DE HOOG, G.S. Environmental siblings of black agents of human chromoblastomycosis. **Fungal Diversity**, 2014.

VICENTE, V.A.; WEISS, V.A.; BOMBASSARO, A.; MORENO, L. F.; COSTA, F. F.; RAITTZ, R.T.; LEÃO, A.C.; GOMES, R.R.; BOCCA, A.L.; FORNARI, G.; DE CASTRO, R.J.A.; SUN, J.; FAORO, H.; TADRA-SFEIR, M.Z.; BAURA, V.; BALSANELLI, E.; ALMEIDA, S.R.; DOS SANTOS, S.S.; TEIXEIRA, M.D.M.; SOARES, F.M.S.; DO NASCIMENTO, M.M.F.; PEDROSA, F.O.; STEFFENS, M.B.; ATTILI-ANGELIS, D.; NAJAFZADEH, M.J.; QUEIROZ-TELLES, F.; SOUZA, E.M.; DE HOOG, G. S. Comparative genomics of sibling species of *Fonsecaea* associated with human chromoblastomycosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n.1924, 2017.

WALKER, D.H.; MCGINNIS, M.R. Diseases caused by fungi. **Pathobiology of Human Disease**, 2014.

WANG, B.; POTTER, S.J.; LIN, Y.; CUNNINGHAM, A.L.; DWYER, D.E.; SU, Y.; MA, X.; HOU, Y.; SAKSENA, N.K. Rapid and Sensitive Detection of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus by Rolling Circle Amplification. **Journal Of Clinical Microbiology**, v.43, n. 5, p. 2339–2344, 2005.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: INNIS, M.A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J.J.; WHITE, T.J. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, p. 315-322. Academic Press: San Diego, U.S.A., 1990.

WILCZYNSKI, S.P. Molecular Biology, In: WEIDNER, N.; COTE, R. J.; SUSTER, S.; WEISS, L.M. **Modern Surgical Pathology**, 2 ed., Elsevier, 2009.

YANG, X.; HAMEED, U.; ZHANG, A.F.; ZANG, H.,Y.; GU, C.Y.; CHEN, Y.; XU, Y.L. Development of a nested-PCR assay for the rapid detection of *Pilidiella granati* in pomegranate fruit. **Scientific Reports**, v.7, p. 40954 1-8, 2017.

YANG, Y.P.; LI, W.; HUANG, W.M.; ZHOU, Y.; FAN, Y. M. Chromoblastomycosis caused by *Fonsecaea*: clinicopathology, susceptibility and molecular identification of seven consecutive cases in southern China. **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, p., 1023-1028, 2013.

ZOU, B.; MA, Y.; WUB, H.; ZHOU,G. Signal amplification by rolling circle amplification on universal flaps yielded from target-specific invasive reaction. **Analyst**, v. 137, p.729–734, 2012.